

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Fyziologie živočichů

Neurobiologie



Bc. Marcela Filipová

Diferenciační potenciál polydendrocytů po fokální cerebrální
ischemii

Differentiation potential of polydendrocytes after focal
cerebral ischemia

Vedoucí diplomové práce: Ing. Miroslava Anděrová, CSc.

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 26.4.2012

Bc. Marcela Filipová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Ing. Miroslavě Anděrové, CSc. za vedení a pomoc při zpracování této diplomové práce, a v neposlední řadě také Mgr. Pavlu Honsovi za trpělivost, pomoc a cenné rady, kterými mi pomohl při vypracování této práce.

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
Abstrakt	10
Abstract	12
1. Úvod	14
2. Literární přehled	15
2.1. Mozková ischemie	15
2.2. Degenerativní změny po fokální mozkové ischemii	17
2.2.1. Změny na molekulární úrovni	17
2.2.2. Vliv růstových faktorů a morfogenů	19
2.2.2.1. Mozkový neurotrofní faktor	19
2.2.2.2. Bazický růstový faktor fibroblastů	20
2.2.2.3. Sonic hedgehog	20
2.2.2.4. Vaskulární endoteliální růstový faktor	22
2.2.3. Změny na buněčné úrovni.....	23
2.2.3.1. Vlastnosti a funkce neuronů v nepoškozeném CNS	23
2.2.3.2. Vlastnosti a funkce gliálních buněk v nepoškozeném CNS	25
2.2.3.2.1. Astrocyty	25
2.2.3.2.2. Oligodendrocyty	26
2.2.3.2.3. Mikroglie	27
2.2.3.3. Reakce neuronů a gliálních buněk na ischemické poškození	27
2.2.3.4. Aktivace mikroglíí	28
2.3. Regenerační procesy v CNS	29
2.3.1. Základy pro vývoj neurogenních zón	29
2.3.2. Gyrus dentatus hipokampu	31
2.3.3. SVZ	32
2.3.4. Indukce neurogeneze a gliogeneze v neurogenních nikách	34
2.3.5. Ne-neurogenní oblasti	35
2.3.6. Polydendrocyty	35

2.3.6.1. Imunocytochemické markery polydendrocytů	38
2.3.6.2. Výskyt polydendrocytů a jejich populace v dospělém nepoškozeném mozku	40
2.3.6.3. Výskyt polydendrocytů v neurogenních nikách	41
2.3.6.4. Polydendrocytické synapse	41
2.3.6.5. Proliferace a diferenciaci polydendrocytů	42
2.3.7. Indukce neurogeneze a gliogeneze v ne-neurogenních oblastech	45
2.3.7.1. Vliv poranění na vlastnosti polydendrocytů	46
3. Cíle práce	47
4. Materiál a metody	48
4.1. Původ buněk	48
4.2. Genotypování myší	48
4.3. Polymerázová řetězová reakce	49
4.4. MCAO	50
4.5. Transkardiální perfúze myši	50
4.6. Kultivace buněk	51
4.7. Metoda terčíkového zámku	51
4.8. Elektrofyzilogická měření, protokoly a analýza	52
4.9. Imunocytochemická identifikace buněk	55
4.10. Konfokální mikroskopie	56
4.11. Statistika	56
5. Výsledky	57
5.1. Charakterizace kortikálních EGFP ⁺ buněk po sedmi dnech kultivace <i>in vitro</i> bez přítomnosti faktorů	57
5.2. Vliv jednotlivých faktorů na vlastnosti EGFP ⁺ buněk v průběhu diferenciaci <i>in vitro</i>	61
5.2.1. Růstové faktory a Shh významně ovlivňují zastoupení jednotlivých buněčných typů	61

5.2.2. Růstové faktory ovlivňují membránové vlastnosti pouze u prekursorového typu buněk	63
5.2.3. BDNF a bFGF ovlivňují proudové charakteristiky prekursorového typu buněk	66
5.2.4. BDNF ovlivňuje amplitudu K_{IR} proudů a výskyt I_{Na} proudů u komplexního typu buněk	69
5.2.5. BDNF ovlivňuje výskyt pasivního typu buněk	70
5.2.6. Výskyt oligodendrocytů	70
5.3. Imunocytochemická analýza buněk kultivovaných pod vlivem jednotlivých faktorů a morfogenů	71
5.4. Vliv MCAO na zastoupení jednotlivých typů buněk a jejich elektrofyziologické a imunocytochemické vlastnosti	73
5.4.1. Ischemické poškození mozku vyvolané MCAO	73
6. Diskuse	77
6.1. BDNF a Shh významně ovlivňují zastoupení jednotlivých buněčných typů	77
6.2. MCAO indukuje proliferaci EGFP ⁺ buněk a jejich zrání do astrocytů	78
7. Závěr	80
8. Seznam použité literatury	81

Seznam zkratek

aCSF = umělý cerebrospinální roztok (artificial cerebrospinal fluid)

AMPA receptor = alfa-amino-hydroxymethyl-izooxazol-propionátový receptor

APC = adenomatosis polyposis coli

ATP = adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)

BDNF = mozkový neurotrofní faktor (brain-derived neurotrophic factor)

bFGF = bazický růstový faktor fibroblastů (basic fibroblast growth factor)

BLBP = mozkový protein vázající lipid (brain lipid binding protein)

BMP = kostní morfogenetický protein (bone morphogenetic protein)

BMPR I, Ib, II = receptor kostního morfogenetického proteinu I, Ib, II (bone morphogenetic protein receptor I, Ib, II)

CD = proudová hustota (current density)

CD_{Na} = proudová hustota tetrodotoxin senzitivních Na proudů (current density of tetrodotoxin-sensitive sodium currents)

CD_{KA} = proudová hustota rychle se aktivujících a inaktivujících vně usměrněných napětově závislých K⁺ proudů (current density of fast activating and inactivating potassium currents)

CD_{KDR} = proudová hustota zpožděných vně usměrněných napětově závislých K⁺ proudů (current density of delayed-rectifying potassium currents)

CD_{KIR} = proudová hustota dovnitř usměrněných napětově závislých K⁺ proudů (current density of inward-rectifying potassium currents)

CNS = centrální nervový systém (central nervous system)

DAPI = 4, 6-diamidino-2-phenylindol

DCX = doublecortin

DMEM/F12 = Dulbeccem modifikované Eaglovo médium: Směs nutrietů F-12 (Dulbecco's modified Eagle medium: Nutrient mixture F-12)

DNA = deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

EGF = epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)

EGFP = zesílený zelený fluorescenční protein (enhanced green fluorescence protein)

FBS = fetální telecí sérum (fetal bovine serum)

eNOS = endoteliální NO syntáza (endothelial NO synthase)

GABA = gama-amino máselná kyselina (gamma-aminobutyric acid)

GCL = granulární buněčná vrstva (granular cell layer)

GFAP = gliální fibrilární acidický protein (glial fibrillary acidic protein)

GFP = zelený fluorescenční protein (green fluorescence protein)

GL = glomerulární vrstva buněk (glomerular layer)

IGF-1 = insulinový růstový faktor 1
(insulin-like growth factor 1)

I_{Na} = tetrodotoxin senzitivní Na proud

iNOS = indukovatelná NO syntáza
(inducible NO synthase)

IR = membránový odpor (input resistance)

K_A = rychle se aktivující a inaktivující vně usměrněný napětově závislý K⁺ proud
(current density of fast activating and inactivating potassium current)

K_{DR} = zpožděný vně usměrněný napětově závislý K⁺ proud (delayed-rectifying potassium current)

K_{IR} = dovnitř usměrněný napětově závislý K⁺ proud (inward-rectifying potassium current)

LNS doména = laminin G/neurexin/pohlavní hormon globulinová vazebná doména (laminin G/neurexin/sex hormone binding globulin domain)

MAP2 = s mikrotubuly asociovaný protein 2 (microtubule-associated protein 2)

MAP kinase = mitogenem aktivovaná protein kináza (mitogen-activated protein kinase)

MCAO = okluze střední mozkové atérie (middle cerebral artery occlusion)

MCL (v gyru dentatu hipokampu) = molekulární buněčná vrstva (molecular cell layer)

MCL (v subventrikulárné zóně) = vrstva mitrálních buněk (mitral cell layer)

NBQX = 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dion

NG2 = neurální/gliální antigen 2
(neural/glial antigen 2)

NGF = nervový růstový faktor (nerve growth factor)

NMDA = N-metyl-D-aspartát

nNOS = neuronální NO syntáza (neuronal NO synthase)

OB = čichový lalok (olfactory bulb)

Olig2 = transkripční faktor oligodendrocytů 2 (oligodendrocyte transcription factor 2)

PBS = fosfátový pufr (phosphate buffer saline)

PCNA = jaderný antigen proliferujících buněk (proliferating cell nuclear antigen)

PCR = polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PDGF α = růstový faktor krevních destiček alfa (platelet-derived growth factor alpha)

PDGFR α = receptor růstového faktoru krevních destiček alfa (platelet-derived growth factor receptor alpha)

PDGFR β = receptor růstového faktoru krevních destiček beta (platelet-derived growth factor receptor beta)

PSA-NCAM = polysialová adhézní molekula neurálních buněk (polysialylated-neural cell adhesion molecule)

Ptch receptor = Patched receptor

RMS = rostrální migrační proud (rostral migratory stream)

S.E.M. = standardní chyba průměru (standard error mean)

SGZ = subgranulární zóna (subgranular zone)

Shh = sonic hedgehog

Smo receptor = Smoothed receptor

SVZ = subventrikulární zóna (subventricular zone)

TGFβ = transformující růstový faktor beta (transforming growth factor beta)

TNFα = nádorový nekrotický faktor alfa (tumor necrosis factor alpha)

TTC = 2,3,5-trifenyl tetrazolium chlorid

TTX = tetrodotoxin

VEGF = vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

VEGFR 1, 2 = receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru 1, 2 (vascular endothelial growth factor receptor 1, 2)

Abstrakt

Po ischemickém poranění dochází k sérii patofyziologických změn, které se projevují výlevem růstových faktorů a morfogenů, které ovlivňují buněčnou proliferaci, migraci a také diferenciaci. Ischemické poškození indukuje neurogenezi a gliogenezi v subventrikulární zóně postranních komor a v gyru dentatu hipokampu, nicméně může probíhat také v oblastech, které nejsou primárně neurogenní, jako je mozková kůra nebo striatum. V poslední době se pozornost obrátila k novému gliálnímu typu, tzv. polydendrocytům neboli NG2 gliím. Za fyziologických podmínek se tyto buňky dělí a jsou schopny dozrávat do dospělých oligodendrocytů, a proto jsou často přirovnávány k prekurzorovým buňkám oligodendrocytů. Ačkoli některé studie ukázaly, že polydendrocyty jsou schopny dozrávat do protoplasmatických astrocytů (Zhu et al., 2008) a neuronů *in vitro* (Belachew et al., 2003), schopnost této diferenciace za fyziologických či patologických podmínek je stále předmětem diskuze.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jaký vliv mají vybrané růstové faktory a morfogeny, konkrétně mozkový neurotrofní faktor (BDNF), bazický růstový faktor fibroblastů (bFGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a morfogen Sonic hedgehog (Shh), na diferenciační potenciál polydendrocytů *in vitro* po jejich izolaci z nepoškozené mozkové kůry. Dále jsme zjišťovali vliv fokální cerebrální ischemie na diferenciační potenciál polydendrocytů *in vitro*. K těmto pokusům jsme použili transgenní myši kmene B6;FVB – Tg(Cspg4-cre)1Akik/J, u kterých po zkřížení s reportérovou myší dochází k označení polydendrocytů zesíleným zeleným fluorescenčním proteinem (EGFP). Pro indukci fokální cerebrální ischemie byla použita metoda okluze střední mozkové artérie (MCAO). Pro všechny pokusy jsme použili EGFP⁺ buňky, které jsme izolovali z mozkové kůry dospělých myší. Po izolaci buněk z nepoškozeného nebo ischemicky poškozeného mozku byly EGFP⁺ buňky 4 týdny kultivovány a poté elektrofyziologicky charakterizovány pomocí metody patch clamp v konfiguraci z celé buňky. Změřené buňky byly následně identifikovány imunocytochemicky. Na základě proudových profilů byly EGFP⁺ buňky rozděleny do tří typů buněk: pasivního, komplexního a prekurzorového typu buněk. Pasivní typ buněk vykazoval symetrické časově a napětově nezávislé pasivní proudy a nízkou hodnotu vstupního odporu. Komplexní typ buněk vykazoval dovnitř usměrněné K⁺ proudy a rychle se aktivující a inaktivující K⁺ proudy. Některé z těchto buněk vykazovaly i malý

dovnitř usměrněný Na^+ proud. Proudový profil prekurzorového typu buněk zahrnoval ven usměrněné K^+ proudy a u některých buněk také rychle se aktivující a inaktivující K^+ proudy. Naše výsledky ukázaly, že Shh udržoval EGFP^+ buňky v prekurzorovém stádiu a také, že jednotlivé faktory ovlivňovaly elektrofyziologické vlastnosti prekurzorového typu buněk, nikoli však komplexního typu buněk. Největší vliv na prekurzorový typ buněk měl faktor bFGF, který depolarizoval klidový membránový potenciál, zvyšoval kapacitanci membrány a proudovou hustotu ven usměrněných K^+ proudů u těchto buněk. Naproti tomu, MCAO indukovala tvorbu pasivního typu buněk, který se u buněk izolovaných z nepoškozené tkáně objevil pouze pod vlivem faktoru BDNF. Na závěr můžeme shrnout, že faktory BDNF, bFGF, VEGF a morfogen Shh ovlivňují membránové vlastnosti prekurzorového typu buněk a také, že fokální cerebrální ischemie zvyšovala zastoupení pasivního typu buněk, který vznikl z EGFP^+ polydendrocytů.

Abstract

Ischemic injury leads to sequence of pathophysiological events, which are accompanied by a release of growth factors and morphogens that significantly affect cell proliferation, migration and also their differentiation. Following ischemia, besides enhanced neurogenesis and gliogenesis in subventricular zone of the lateral ventricles and gyrus dentatus of the hippocampus, neurogenesis/gliogenesis also occurs in non-neurogenic regions, such as cortex or striatum. Recently, the attention was turned to a new glial cell type, termed polydendrocytes or NG2 glia. Under physiological conditions, these cells are able to divide and differentiate into mature oligodendrocytes due to they have often been equated with oligodendrocyte precursor cells. Based on recent reports, polydendrocytes are also able to generate protoplasmic astrocytes (Zhu et al., 2008) and neurons *in vitro* (Belachew et al., 2003), however their ability to differentiate into astrocytes or neurons under physiological or pathological conditions is still highly debated.

Therefore, we have investigated the effect of different growth factors and morphogens, specifically brain-derived neurotrophic factor (BDNF), basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and a morphogen sonic hedgehog (Shh), on differentiation potential of polydendrocytes *in vitro* after their isolation from non-injured cortex. Furthermore, we have investigated polydendrocyte differentiation potential *in vitro* following focal cerebral ischemia. We have used transgenic mice, B6;FVB – Tg(Cspg4-cre)1Akik/J, in which, after cross-breeding with reporter mice, the polydendrocytes were labeled by enhanced green fluorescent protein (EGFP). A middle cerebral artery occlusion (MCAO) was employed to induce focal cerebral ischemia. For all experiments, we used EGFP⁺ cells isolated from the adult mouse cortex. Following cell isolation, either from non-injured or ischemic brains, the cells were cultured for 4 weeks and electrophysiologically characterized using patch clamp technique in whole-cell configuration. Recorded cells were identified immunocytochemically. According to their current profile, the EGFP⁺ cells were divided into three cell types; namely passive, complex and precursor type of cells. Passive cell type typically expressed symmetrical, time- and voltage-independent passive currents and low input resistance. Complex cell type displayed inwardly rectifying K⁺ currents, delayed outwardly rectifying K⁺ currents and fast activating and inactivating K⁺ currents. Some cells also showed small inwardly rectifying Na⁺ currents. The current pattern of precursor cell type

included delayed outwardly rectifying K^+ currents and in some cases, also fast activating and inactivating K^+ currents. Our results revealed that Shh maintained EGFP⁺ cells in precursor stage and other factors influenced electrophysiological properties of precursor cell type, but not complex type of cells. bFGF had the most significant effect on precursor type of cells resulting in depolarized resting membrane potential, increased membrane capacitance and high current density of delayed outwardly rectifying K^+ currents. Moreover, focal cerebral ischemia promoted incidence of passive cell type, which also occurred in cell culture isolated from non-injured cortex after exposure to BDNF. Thus we can conclude that factors BDNF, bFGF, VEGF and Shh influence membrane properties of precursor cell type and that focal cerebral ischemia increases proportion of passive cell type originating from EGFP⁺ polydendrocytes.

1. Úvod

Mozková ischemie je jednou z forem cévní mozkové příhody, která se ročně, jen v České republice, objeví nově u 300 lidí na 100 000 obyvatel (Kalita a kol., 2006). I přes stále se zlepšující výsledky současné medicíny v léčbě mnohých chorob nebyla doposud vyvinuta úspěšná léčebná strategie, která by umožňovala plné zotavení pacientům, kteří prodělali toto závažné onemocnění. Z tohoto důvodu je jedním ze současných proudů výzkumu i studium tkáňových reparací, jejichž základ tvoří kmenové a progenitorové buňky přirozeně se vyskytující v dospělém mozku.

V posledních letech v této souvislosti vzbudil velký zájem právě výzkum polydendrocytů. Polydendrocyty patří mezi gliové buňky, které v dospělém mozku zřejmě fungují jako prekursor oligodendrocytů (Zhu et al., 2008). Cílenou diferenciací a dalším výzkumem však bylo zjištěno, že tyto buňky dokážou dozrávat do dalších buněčných typů – astrocytů a neuronů (Belachew et al., 2003, Zhu et al., 2008). Proto se další výzkum zaměřil na mechanismy, které polydendrocytům umožňují dozrávat v různé buněčné typy a na jejich využití (například vytvořením správného prostředí s dostatečným množstvím růstových faktorů) k náhradě ztracených buněk po poškození CNS, ať již ischemickém nebo jiném typu poškození.

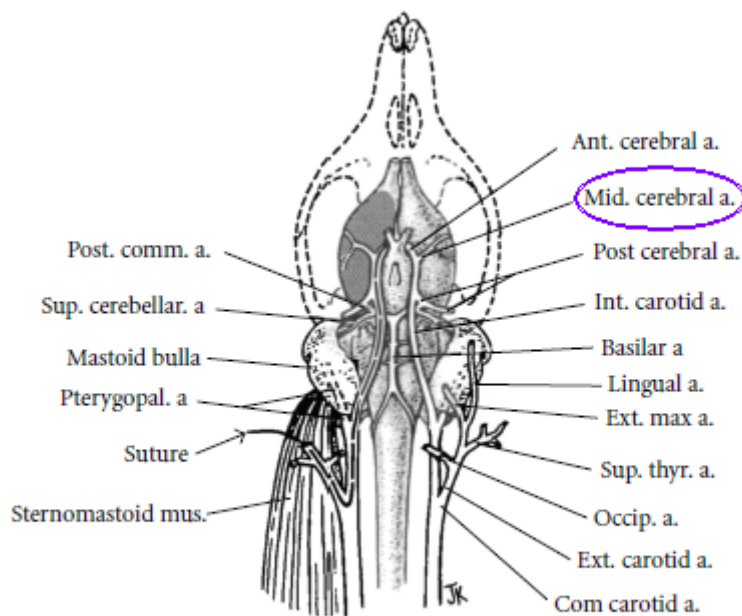
Tato diplomová práce podává souhrnný přehled o stavu současných poznatků známých o polydendrocytech a zároveň má za cíl objasnit některé z nevyřešených otázek v této problematice: i) jaký je diferenciační potenciál polydendrocytů v nepoškozeném mozku, ii) jaký je vliv růstových faktorů, jako je mozkový růstový faktor (BDNF), bazický růstový faktor fibroblastů (bFGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a morfogen sonic hedgehog (Shh), na diferenciační potenciál těchto buněk. V diplomové práci je dále porovnáván vliv ischemického poškození, po provedení okluze střední mozkové artérie, na diferenciační potenciál polydendrocytů v mozkové kůře dospělé myši.

2. Literární přehled

2.1. Mozková ischemie

Ischemická cévní mozková příhoda neboli ischemie patří k hlavním příčinám úmrtí ve světě (Liu a McCullough, 2011). Je zapříčiněna nedostatečným zásobením mozku krví (například následkem trombotického uzávěru některé z hlavních tepen nebo poklesem průtoku krve v těchto tepnách). Tento nejčastěji se vyskytující typ mozkové příhody postihuje jedince ve věku 60-70 let, jejichž úmrtnost se pohybuje okolo 20 % případů (<http://www.zbynekmlcoch.cz/informace/medicina/neurologie-nemoci-vysetreni/cevni-mozkova-prihoda-mrtvice-komplexni-clanek-trombolyza-fibrinolyza>).

V souvislosti s vývojem a typem ischemické cévní mozkové příhody rozlišujeme dva typy mozkové ischemie, globální a fokální. Při častější *fokální ischemii* dochází k přechodnému snížení nebo zástavě přívodu krve, což indukuje patofyziologické změny na molekulární a buněčné úrovni. Při trvalé (permanentní) ischemii, při které dojde k úplnému zamezení průtoku krve, dochází k vytvoření tzv. ischemického jádra, od kterého se šíří degenerativní změny oblastí méně poškozené tkáně (tzv. penumbrou; Hunter et al., 1995). V laboratorních podmínkách může být fokální ischemie imitována několika modely, z nichž se nejběžněji používá model, který je založen na okluzi střední mozkové artérie (MCAO; **obr. č. 1**; Liu a McCullough, 2011).



Obrázek č. 1: Schéma vypreparovaných cév, které zásobují mozek a hlavu myši. Fokální cerebrální ischemie se nejčastěji indukuje uzavřením průtoku krve ve střední mozkové artérii (Liu a McCullough, 2011).

Zamezení průtoku krve střední mozkovou artérií může být provedeno například injikováním sraženiny, která omezí průtok krve (embolický model uzavření střední mozkové artérie), který může být obnoven pomocí látek, které mají trombolytický efekt, jako například tkáňový aktivátor plasminogenu nebo urokináza (Fan et al., 2012, Kim et al., 1993). Zúžení střední mozkové artérie a proximálních artérií lze dále indukovat prostřednictvím endotelinu 1 (Mecca et al., 2009) nebo fotochemickou indukcí trombózy, a to tak, že se do žíly injikuje speciální chemické barvivo, Bengálská červeň, která při kontaktu se světlem určité vlnové délky vytvoří sraženinu a zamezí průtoku krve (Markgraf et al., 1993). Další možností je zavedení silikonového filamentu do střední mozkové artérie, čímž dojde k jejímu uzavření. Filament může být v cévě ponechán trvale (vzniká tzv. trvalá ischemie) nebo odstraněn po 30 až 90 minutách, což zapříčiní obnovení průtoku krve do mozku (vzniká tzv. přechodná ischemie). Touto metodou je vyvolána nekróza buněk striata a neokortexu a rozsah infarktu závisí na délce uzavření průtoku krve (Engel et al., 2011). Model, který byl použit pro vyvolání fokální cerebrální ischemie v předkládané diplomové práci, se nazývá *transkraniální okluze střední mozkové artérie* a lze ho provést např. kauterizací, při které dojde k zatavení

střední mozkové artérie (Brint et al., 1988) nebo ligací, při níž se prostřednictvím filamentu zaškrtí střední mozková artérie (Coyle a Feng, 1993).

Další typ ischemie, tzv. *globální ischemii* můžeme rozdělit na kompletní a nekompletní ischemii. Kompletní (celková) globální ischemie nastává při somatické smrti a lze ji provést několika způsoby: zástavou srdce, uzavřením aorty, dekapitací, uzavřením cefalické žíly nebo podvázáním krčních cév. Tento model ischemie se používá zejména ke studiu rozkladných procesů, které se vyskytují po smrti organismu (Liu a McCullough, 2011), http://atlases.muni.cz/atlases/stud/atl_cz/main+cnspatol+porkrobcs.html#ischem+komplisch.

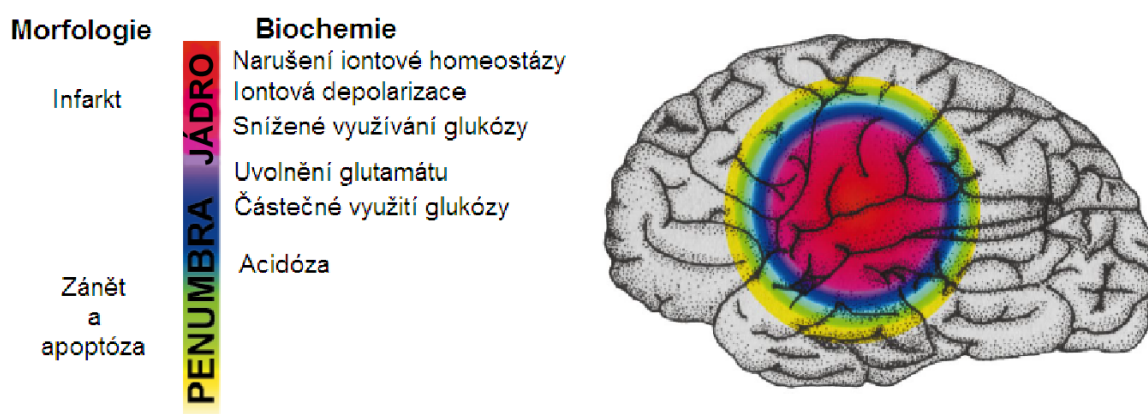
Nekompletní (částečná) globální ischemie více modeluje ischemické poškození probíhající v mozku. Dá se provést několika způsoby: silným krvácením, popř. snížením tlaku, hypoxií-ischemií, jednostranným uzavřením artérie carotis nebo zastavením průtoku krve ve dvou popř. čtyřech cévách (Liu a McCullough, 2011). Omezení průtoku krve ve dvou artériích carotis se provádí pomocí chemických látek trimetafanu nebo pentolaminu, které sníží krevní tlak (Smith et al., 1984). U uzavření průtoku krve ve čtyřech cévách, které zásobují mozek, nejprve dojde k trvalému uzavření vertebrálních cév a po 24 hodinách k přechodnému uzavření artérií carotis, v nichž je po určitém čase průtok krve opět obnoven. Po nekompletní globální ischemii vzniká poškození především v kortexu, hipokampu a striatu (Thal et al., 2010).

2.2. Degenerativní změny po fokální mozkové ischemii

2.2.1. Změny na molekulární úrovni

Po indukci fokální mozkové ischemie dochází k patofyziologickým změnám, které se uskutečňují prostřednictvím změn na molekulární a buněčné úrovni. Při zamezení průtoku krve do určité části mozku, dochází k nedostatečnému zásobování buněk CNS kyslíkem a glukózou, které jsou potřebné pro tvorbu ATP aerobním metabolismem. Z tohoto důvodu musí buňky přejít na anaerobní tvorbu glukózy, při níž dochází k tvorbě kyseliny mléčné, která je příčinou acidifikace intracelulárního a extracelulárního prostředí. Anaerobní glykolýza navíc produkuje menší množství ATP než aerobní glykolýza, což způsobí, že buněčné pumpy, které za normálních okolností udržují iontovou homeostázu v jednotlivých buňkách, nejsou schopny vyrovnávat tok iontů, které pasivně vtékají (Na^+ a Ca^{2+}) nebo

vytékají (K^+ a Cl^-) do, popř. ven z buněk, což vede k neřízené depolarizaci buněk. Vtokem Na^+ a výtokem Cl^- iontů se zvyšuje osmotický gradient, který umožňuje vtok vody do buněk a dochází ke zvětšování objemu neuronů a astrocytů, vzniká tzv. cytogenní a vasogenní edém (Macdonald a Stoodley, 1998). Ca^{2+} ionty jsou v intracelulárním prostoru za fyziologických podmínek udržovány v nanomolárních koncentracích, po ischemii dochází k nadměrnému výlevu těchto iontů do intracelulárního prostoru. Vzhledem k tomu, že Ca^{2+} slouží v buňkách jako signální molekula, jeho nadměrné zvýšení spouští reakce, které vedou například k indukci neuronální NO syntázy (nNOS), která vytváří z aminokyseliny L-argininu oxid dusnatý (NO), což je plynný volný radikál, který uvnitř buňky funguje jako druhý posel v signalizačních drahách (Sulz a Bacigalupo, 2006). NO také působí na mitochondrie, ve kterých může stimulovat produkci volných radikálů, které přispívají k oxidačnímu stresu buněk (Mehta et al., 2007) a mohou poškozovat deoxyribonukleovou kyselinu (DNA) a indukovat apoptózu buněk (**obr. č. 2**; Dirnagl et al., 1999). Po ischemii dochází k nadměrnému uvolňování glutamátu, který v CNS funguje jako hlavní excitační neuropřenašeč. Tím, že astrocyty nemají dostatečné energetické zásoby, nemohou efektivně vychytávat glutamát z okolí buněk (Dobrek a Thor, 2011), což vede k nadměrnému hromadění glutamátu a následné aktivaci NMDA (N-metyl-D-aspartát) a AMPA (alfa-amino-hydroxymetyl-izooxazol-propionátových) glutamátových receptorů, čímž se spouští proces reaktivní gliózy (Hamilton et al., 2009).



Obrázek č. 2: Děje probíhající v ischemickém jádře a penumbře. Během ischemického poškození dochází k tvorbě tzv. ischemického jádra (červeně) a okolní oblasti tzv. penumbry (modrá, zelená, žlutá). V ischemickém jádře dochází ke snížené tvorbě ATP, sníženému pH, cytotoxickému edému, nadměrnému výlevu glutamátu, k narušení iontové homeostázy (Na^+ , K^+ , Cl^- a Ca^{2+}) a produkci volných radikálů. Směrem od jádra (v oblasti penumbry) se intenzita těchto procesů postupně snižuje (Dirnagl et al., 1999).

2.2.2. Vliv růstových faktorů a morfogenů

Po ischemickém poškození se do okolí poranění uvolňuje velké množství látek a růstových faktorů (Cheung et al., 2000, Lin et al., 1997, Yang et al., 2012), které ovlivňují diferenciaci buněk do neuronů a glií (Li et al., 2011a, Sypecka et al., 2009). V této diplomové práci se zaměříme na vliv tří růstových faktorů a jednoho morfogenu, jejichž vliv na buňky v CNS je zmíněn níže.

2.2.2.1. *Mozkový neurotrofní faktor*

Mozkový neurotrofní faktor (BDNF) patří do rodiny neurotrofinů, z nichž některé zvyšují proliferaci buněk (např. BDNF spolu s nervovým růstovým faktorem NGF; Mooney a Miller, 2011). BDNF v hipokampu podporuje neurogenezi granulárních buněk a zvyšuje tvorbu nových neuronů v gyru dentatu (Scharfman et al., 2005).

Zda má BDNF stimulační nebo naopak inhibiční účinky na neurogenezi a gliogenezi v dospělém mozku není zatím zcela jasné. Ukázalo se, že dlouhodobé působení BDNF na progenitorové buňky mozku brání jejich dozrávání v dospělé neurony, ačkoli proliferace a přežívání nově vytvořených buněk není ovlivněna (Larsson et al., 2002). U neuroblastů, které putují ze subventrikulární zóny (SVZ) do čichového laloku bylo ukázáno, že BDNF v koncentraci pod 5 ng/ml zvyšuje množství migrujících buněk, naopak ve vyšším množství (100 ng/ml) podporuje dozrávání neuroblastů do neuronů (Petridis a El Maarouf, 2011). Na druhou stranu, transplantace BDNF-stimulovaných buněk do okolí poranění vede k jejich vcestování do ischemické oblasti, kde jsou schopny přežít a dozrávat v neurony (Zhu et al., 2011a). BDNF také ovlivňuje elektrofyziologické vlastnosti neurálních kmenových buněk, ve kterých prostřednictvím modulace pasivních membránových vlastností a indukcí, resp. potlačením některých typů draslíkových nebo sodných proudů, zastavuje dělení nezralých buněk a podporuje jejich zrání (Leng et al., 2009). BDNF je příkladem faktoru, který ke svému působení potřebuje pomocníka. Tímto pomocníkem je epidermální růstový faktor (EGF). Pokud byly neurální kmenové buňky aktivovány pomocí EGF a následně inkubovány s BDNF, docházelo ke zvýšené buněčné proliferaci a migraci. Zdá se, že BDNF slouží v tomto případě k posílení samotného působení EGF, a to přes PI3K/Akt dráhu, která se uplatňuje v přežívání a proliferaci buněk (Zhang et al., 2011). BDNF také zvyšuje tvorbu

neuronů v hilu gyru dentatu (Scharfman et al., 2005) a za určitých podmínek u neuronů zadních kořenů míšních stimuluje růst dendritů a axonů (Zhu et al., 2011a).

2.2.2.2. *Bazický růstový faktor fibroblastů*

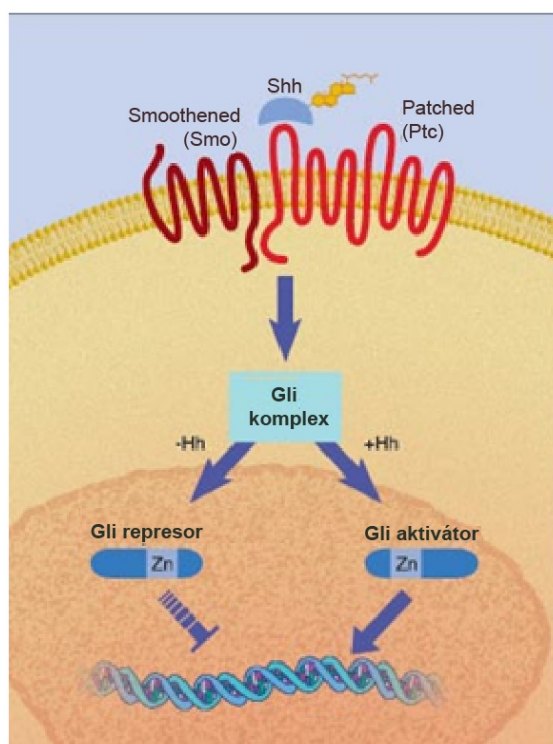
Bazický růstový faktor fibroblastů (bFGF) patří do rodiny heparin vázajících růstových faktorů (Yayon et al., 1991). Tento protein se uvolňuje po ischemickém poškození uvnitř místa infarktu i v peri-infarktové oblasti a uvolněné množství se zvyšuje s velikostí infarktové oblasti (Guo et al., 2006). Doba, po kterou trvá jeho zvýšená koncentrace, se mění v různých oblastech mozku. Například v mozkové kůře je jeho množství nejvyšší 12 a 24 hodin po poranění (poté zvolna klesá), zatímco v hipokampu přetrvává zvýšená koncentrace po dva týdny (Lin et al., 1997). Ukazuje se, že zvýšené množství bFGF uvolněné po ischemii snižuje deficit v učení a paměti, který se vyskytuje právě po tomto typu poranění, a to prostřednictvím zvýšené tvorby cholinergních neuronů v hipokampu (Ye et al., 2010). Při studiu vlivu bFGF na buňky *in vitro*, které byly izolované z nepoškozeného mozku, se ukázalo, že bFGF má poměrně slabý mitogenní účinek, pokud působí bez pomoci jiných faktorů, jako je například růstový faktor krevních destiček α (PDGF α) nebo fetální telecí sérum (FBS; Kondo a Raff, 2000). Po ischemickém poranění se však jeho vliv mění a vede k nastartování buněčné proliferace, která přetrvává 14 dní po ischemii, a k podpoře buněčné diferenciace, při níž dochází k dozrávání astrocytů, neuronů i polydendrocytů (Jin-qiao et al., 2009). Na druhou stranu, přímým testováním vlivu bFGF na buňky v mozku se ukázalo, že podporuje tvorbu astroglálních buněk, nikoli však neuronů či oligodendrocytů (Thau-Zuchman et al., 2012).

2.2.2.3. *Sonic hedgehog*

Sonic hedgehog (Shh) je morfogen, který se během embryonálního vývoje poprvé uplatňuje při ventralizaci nervové trubice při tvorbě CNS (Jessell, 2000). Shh signální dráha je založena na proteinu Shh, který se váže na transmembránový receptor Patched (Ptch), jenž je asociován s transmembránovým proteinem Smoothed (Smo). Protein Smo patří mezi G-proteiny a slouží jako přenašeč signálu na další efektorovou molekulu, transkripční faktor Gli. Pokud není přítomen Shh, inhibuje protein Ptch transmembránový protein Smo, který působí na transkripční faktor Gli, jenž v tomto případě působí jako represor. Pokud je

ovšem Shh přítomen a naváže se na receptor Ptch, dochází ke zrušení inhibice mezi receptory Ptch a Smo a transkripční faktor Gli působí jako aktivátor pro určité geny na DNA (**obr. č. 3**; McMahon, 2000).

V perinatálním mozku se Shh uvolňuje pouze v určitých oblastech, jmenovitě v Purkyňově vrstvě mozečku, tekty středního mozku a v mozkové kůře. Zde se váže na receptor Ptch a přes protein Smo aktivuje transkripční faktory Gli1, Gli2 nebo Gli3. Zatímco zvýšení produkce Gli2 a Gli3 je pouze mírné, Gli1 vzniká ve velkém množství v gyru dentatu hipokampu a ve ventrikulární zóně (Dahmane et al., 2001).



Obrázek č. 3: Schéma Shh signalizační dráhy. Shh se váže na Ptch receptor, který je komunikuje s receptorem Smo. Smo receptor převádí signál na transkripční faktory skupiny Gli, které mohou fungovat jako aktivátory i jako represory (McMahon, 2000),

(http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR02_SonicHedgeHog.aspx).

V hipokampu působí Shh na různé buněčné typy. U kmenových buněk SVZ, u kterých dochází ke zvýšené tvorbě transkripčního faktoru Gli1 (Palma et al., 2005), Shh signalizační dráha zvyšuje míru proliferace a dozrávání v dospělé buněčné typy (Amankulor et al., 2009, Wang et al., 2007a). Dále bylo zjištěno, že během vývoje hipokampálních neuronů dochází k tvorbě receptorů Ptch a Smo, které jsou postupně umístěny na výběžky, dendritické trny a synaptická zakončení, kde přetrvávají až do dospělosti (Petrálie et al., 2011). V SVZ působí

Shh také na astrocyty, což způsobí již zmíněné zvýšení buněčné proliferace (Prajero et al., 2010a), které v konečném důsledku vede ke zvýšení migrujících neuroblastů a posléze i počtu neuronů v granulární vrstvě čichového laloku (Palma et al., 2005). Shh je také (stejně jako BDNF nebo bFGF) příkladem morfogenu, který sám o sobě nemá na buňky žádný efekt a potřebuje ke svému plnému působení spolupracovat se svým synergistou EGF, se kterým musí být v určitém poměru. Pokud je tento poměr narušen, Shh nepůsobí ve svém maximálním rozsahu (Palma et al., 2005).

Po poranění dochází ke zvýšenému uvolňování prozánětlivých cytokinů, a tím i k aktivaci astrocytů, které začnou ve zvýšené míře produkovat protein Shh. Dále dochází k vyšší tvorbě transmembránového receptoru Ptch a naopak k nižší tvorbě receptoru Smo, a to ve stejný okamžik a pouze ve dvou vrstvách gyru dentatu (subgranulární a granulární buněčné vrstvě). V SVZ receptory signalizační dráhy Shh nevykazují žádné změny. Poranění působí také na zvýšenou produkci Gli1 receptoru na astrocytech. Tato zvýšená produkce jednotlivých komponent Shh dráhy je pouze přechodná a navrácí se k normálním hodnotám nejdéle do 14 dnů po poranění (Amankulor et al., 2009, Banerjee et al., 2005).

2.2.2.4. *Vaskulární endoteliální růstový faktor*

Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) je trofický faktor, který se uvolňuje v poškozené a částečně i nepoškozené hemisféře poraněného mozku (Cheung et al., 2000). Uvolňuje se z mnoha buněčných typů jako jsou endotelové buňky, makrofágy, aktivované krevní destičky, lymfocyty T, hladké svaly, buňky ledvin, keratinocyty, osteoblasty, nádorové buňky a v mozku především z astrocytů a neurálních kmenových buněk (Nowacka a Obuchowicz, 2012). VEGF je neurotrofický faktor (Sondell et al., 2000), který se realizuje prostřednictvím vazby na několik typů receptorů, z nichž dva, receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru 1 a 2 (VEGFR 1, 2), jsou receptory příbuzné s tyrosin kinázovými receptory (Li et al., 2011b).

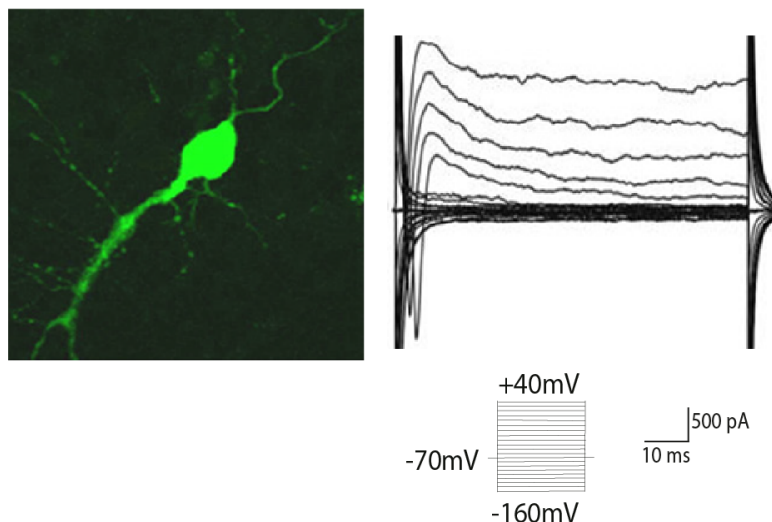
Během poranění, kdy dochází k poškození cévního řečiště, se VEGF uplatňuje v jeho remodelaci a tvorbě nových cév (Li et al., 2011b, Thau-Zuchman et al., 2012, Wang et al., 2009). Na povrchu migrujících neuroblastů, které po poranění cestují do místa poškození, dochází k tvorbě VEGFR 2. Tento receptor váže VEGF a dochází tak k podpoře tvorby, migrace a dozrávání nově vzniklých neuronů (Li et al., 2011b). Po ischemickém poškození

VEGF zmenšuje velikost infarktové oblasti (Wang et al., 2009), zvyšuje neurogenezi v okolí poranění a má neuroprotektivní účinky. Namnožené buňky pak mohou dozrávat do neuronů, astrocytů i oligodendrocytů, zejména v corpus callosum (Thau-Zuchman et al., 2012). VEGF také působí v ne-neurogenních oblastech (septum, striatum či frontální kůra), kde podporuje proliferaci buněk, prodlužování a větvení jejich výběžků, a tím i jejich dozrávání v dospělé neurony (Wang et al., 2009). V neurogenních oblastech (konkrétně v SVZ) působí přes VEGFR 1 a 2 na neurální kmenové buňky, které dozrávají v astrocyty nebo neurony (Ara et al., 2010). V SVZ VEGF zvyšuje bazální proliferaci buněk a zároveň po poranění zvyšuje množství buněk, které migrují ze SVZ do ischemického poškození mozkové kůry (Wang et al., 2007b). Ačkoli je u některých faktorů prokázáno, že společným působením mohou mít zesilující efekt na tvorbu určitých typů buněk (Kondo a Raff, 2000, Palma et al., 2005, Zhang et al., 2011), u VEGF v kombinaci s bFGF se tento synergismus neprokázal a samotný VEGF má dostatečně silný vliv na jednotlivé typy nervových buněk (neurony, astrocyty i oligodendrocyty; Thau-Zuchman et al., 2012).

2.2.3. Změny na buněčné úrovni

2.2.3.1. Vlastnosti a funkce neuronů v nepoškozeném CNS

Dospělé neurony vznikají z embryonálních kmenových buněk (Risner-Janiczek et al., 2011). V různých oblastech mozku se vyskytují morfologicky odlišné typy neuronů, které jsou dokonale přizpůsobeny své konkrétní funkci. Pro postnatální neurony jsou typická malá těla vřetenovitého tvaru, s jedním nebo dvěma výběžky, tzv. bipolární morfologie (**obr. č. 4**; Leng et al., 2009, Risner-Janiczek et al., 2011).



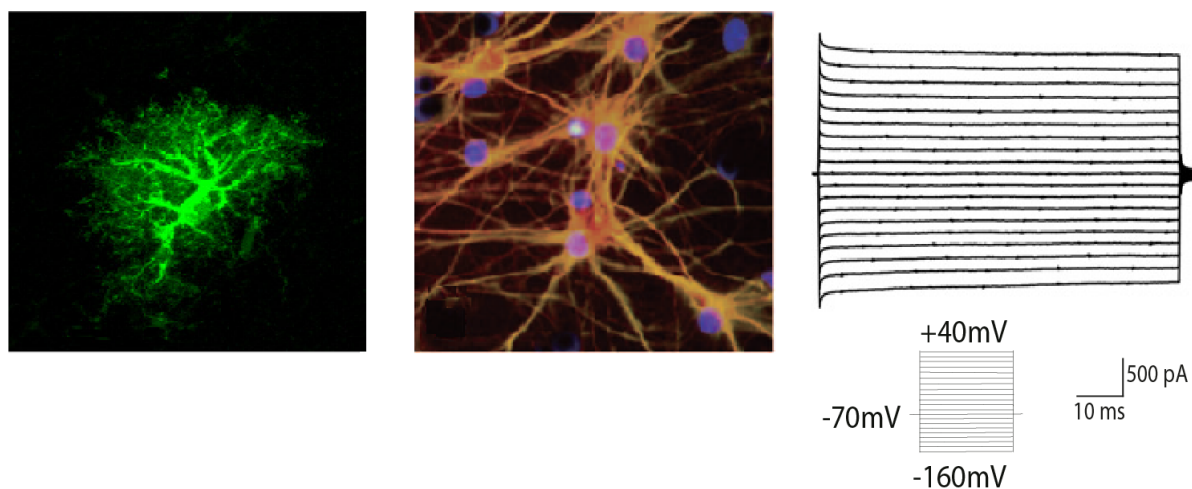
Obrázek č. 4: Typická morfologie a elektrofyziologická charakteristika postnatálního neuronu vzniklého z embryonálních kmenových buněk (Chen et al., 2008, Prajerova et al., 2010b).

Při vývoji neuronů z embryonálních kmenových buněk získávají tyto buňky postupně elektrofyziologické vlastnosti, jež jsou typické pro dospělé neurony. Dochází k ustálení klidového membránového potenciálu v rozmezí od -10 do -45 mV, získávají vyšší vstupní odpor okolo 1340 MΩ a jejich kapacitance membrány je ~ 12 pF, což odpovídá malé velikosti jejich těla. Zralé neurony vykazují zpožděné vně usměrněné napětově závislé K^+ proudy (K_{DR}) o velké amplitudě (Risner-Janiczek et al., 2011), velké dovnitř usměrněné sodné proudy (I_{Na}) a akční potenciály (Chen et al., 2008, Risner-Janiczek et al., 2011). Mezi obvyklé imunocytochemické markery používající se pro identifikaci zrajících neuronů patří doublecortin (DCX), pro dospělé, diferencované neurony se používá například s mikrotubuly asociovaný protein 2 (MAP2). DCX je protein, který stabilizuje mikrotubuly tak, že inhibuje jejich depolymerizaci (Moore et al., 2006), proto ho nalézáme především v neuronálních výbězcích. MAP2 také stabilizuje mikrotubuly, čímž nepřímo vyvolává jejich shlukování, což vede k jejich lepšímu příčnému propojení (Dehmelt a Halpain, 2005).

2.2.3.2. Vlastnosti a funkce gliálních buněk v nepoškozeném CNS

2.2.3.2.1. Astrocyty

V nepoškozeném mozku se vyskytují dva základní typy astrocytů, protoplasmatické astrocyty neboli astrocyty typu 1 a fibrózní astrocyty neboli astrocyty typu 2. Astrocyty fungují v mozku jako „rodiče“ neuronů, kteří jim poskytují výživu (glukózu, laktát), metabolické substráty a zajišťují homeostázu prostředí (udržováním určité koncentrace iontů a pH, odstraňováním metabolických odpadních produktů a očišťováním synaptické štěrby po výlevu neuropřenašečů). Dále fungují jako dynamická síť, která zajišťuje oporu pro neurony (Nedergaard et al., 2003). *Protoplasmatické astrocyty* (**obr. č. 5**) jsou terminálně diferencované astrocyty, které se vyskytují v šedé hmotě. Mají malá, kulatá těla s komplexními, hustými výběžky, které vybíhají do všech stran (Guo et al., 2009, Oberheim et al., 2012). *Fibrózní astrocyty* jsou oproti protoplasmatickým astrocytům méně komplexní buňky s menším množstvím dlouhých, nevětvených výběžků, které se vyskytují v bílé hmotě (Oberheim et al., 2012).



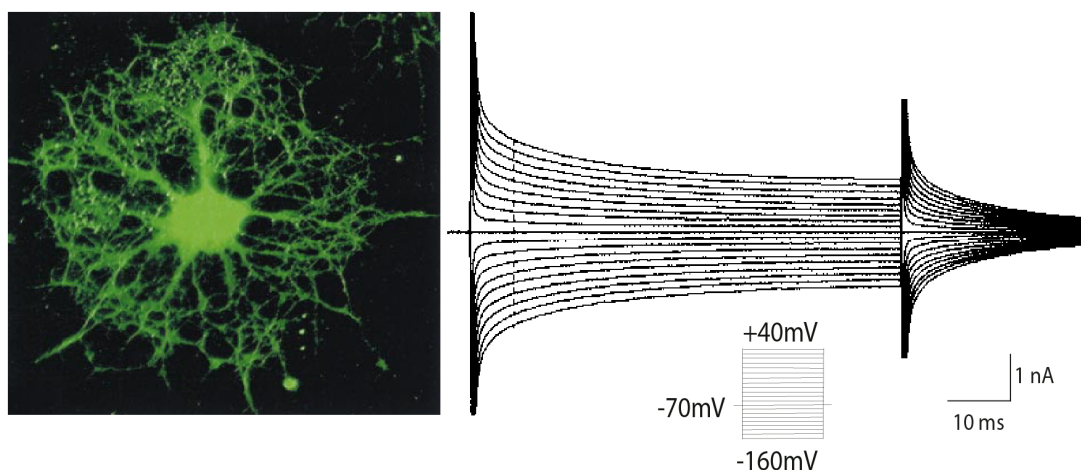
Obrázek č. 5: Morfologie a elektrofyziologické vlastnosti astrocytů. Typická morfologie protoplasmatického astrocytu (vlevo), uprostřed pak fibrózního astrocytu. Typická proudová charakteristika astrocytů, tj. výrazné na čase a napětí nezávislé pasivní proudy, které v průběhu napěťového pulzu neklesají (vpravo; Hu et al., 2010, Mishima a Hirase, 2010, Pivonkova et al., 2010).

Pro astrocyty mozkové kůry je typický mírně hyperpolarizovaný klidový membránový potenciál, jehož průměrná hodnota se pohybuje v rozmezí od -80 do -90 mV. Jejich

membránový odpor se mění od 40 do 50 M Ω (Mishima a Hirase, 2010) a mají typické časově a napětově nezávislé pasivní proudy (Filippov et al., 2003). Jednotlivé astrocyty jsou mezi sebou navzájem propojeny prostřednictvím vodivých spojů tzv. gap junctions a na své membráně exprimují velké množství draslíkových kanálů, jejichž prostřednictvím udržují homeostázu draslíku, která je narušována při přenosu elektrických signálů (vzruchů; Adermark a Lovinger, 2008, Isokawa a McKhann, 2005).

2.2.3.2.2. *Oligodendrocyty*

Oligodendrocyty zastupují v CNS populaci buněk, jejichž primárním úkolem je tvorba myelinové pochvy kolem axonálních výběžků. Tím zesilují izolaci buněčné membrány a zvyšují tak vnější odpor, čímž umožňují efektivnější přenos nervového vzruchu. Oligodendro-



Obrázek č. 6: Morfologie a elektrofyziologické vlastnosti oligodendrocytů. Morfologie typická pro zralý oligodendrocyt (vlevo), elektrofyziologická charakteristika oligodendrocytu, tj. na čas a napětí nezávislé pasivní proudy, které výrazně klesají v průběhu napětového pulzu (vpravo; Chvatal et al., 1999, Osterhout et al., 1999).

cyty mají kulatá až oválná těla s mnoha jemnými, rovnoběžnými výběžky (**obr. č. 6**; Guo et al., 2009). Ačkoli oligodendrocyty, které se vyskytují v bílé a šedé hmotě vznikají v embryonálním vývoji ze dvou subpopulací prekursorů oligodendrocytů, které pocházejí buď z ventrálního, nebo z dorzálního koncového mozku (telencefalonu), tyto subpopulace se po elektrofyziologické stránce nijak neliší a ani oligodendrocyty, které z nich vznikají, nedisponují významně odlišnými elektrofyziologickými vlastnostmi (Tripathi et al., 2011). Průměrná hodnota klidového membránového potenciálu oligodendrocytů je přibližně -60 mV,

kapacitance membrány činí asi 50 pF a membránový odpor se pohybuje v rozmezí od 300 do 400 M Ω (Bakiri et al., 2011, De Biase et al., 2010).

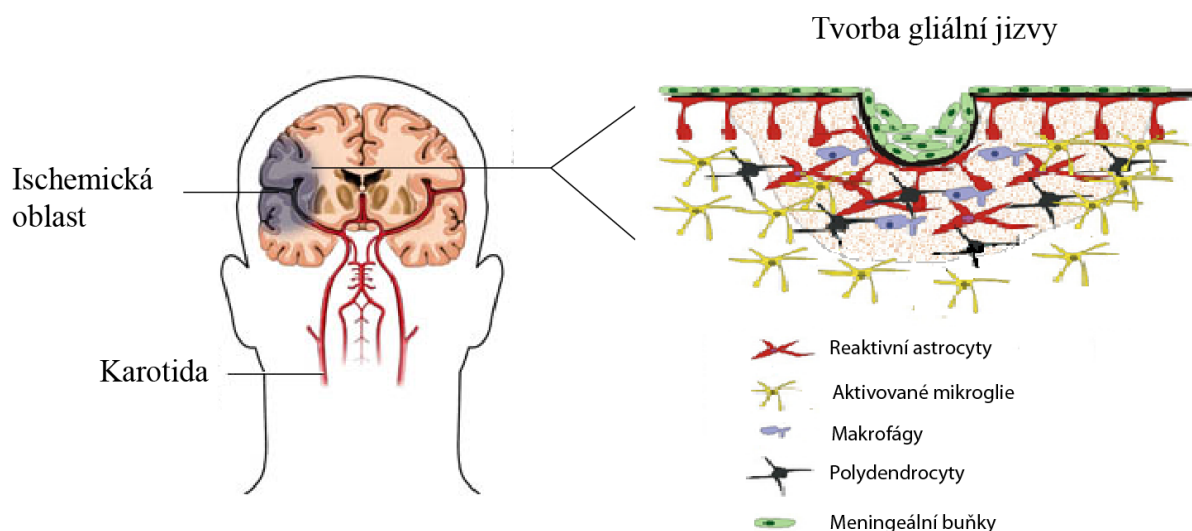
2.2.3.2.3. *Mikroglie*

Mikroglie jsou buňky monocytomakrofágového původu, které v CNS fungují jako buňky imunitního systému. V klidovém stavu, tzn. v nepoškozeném mozku, kontrolují mikroglie nahodilým pohybem svých výběžků, který se pohybuje v rozmezí 1,2 až 1,5 $\mu\text{m}/\text{min}$, extracelulární prostor CNS (Verkhratsky a Butt, 2007).

2.2.3.3. *Reakce neuronů a gliálních buněk na ischemické poškození*

V nepoškozeném dospělém mozku jsou neuronální a gliální buňky (astrocyty, mikroglie, polydendrocyty a oligodendrocyty) celistvě rozmístěny ve tkáni kůry (Alonso, 2005). Po ischemii jsou prvními zasaženými buňkami neurony. Nedostatkem přísunu kyslíku dochází k aktivaci pro-apoptické kaspázy-3 a neurony postupně odumírají v průběhu jednoho týdne po poranění (Jie et al., 2011), během kterého (po obnovení průtoku krve) odumře až ~ 75 % neuronů v CA1 oblasti hipokampu (Anderova et al., 2011).

Gliální buňky reagují na ischemické poranění tzv. *korovou a podkorovou reaktivní gliózou* (Jin-qiao et al., 2009), při níž dochází k fyzickému oddělení poškozené tkáně od tkáně zdravé pomocí gliální jizvy. Krátce po poranění dochází k vycestování pericytů z rozrušených krevních kapilár do místa poranění a následně k jejich dělení, vznikají tak od pericytů odvozené buňky, které se hromadí ve středu gliální jizvy. Na tomto středu leží vrstva astrocytů, které se dělí a jejichž původ není přesně znám. Ačkoli astrocyty po ischemickém poranění tvoří až 30 % z celkového počtu buněk, dělí se pouhých 8 % těchto astrocytů, což je zanedbatelné množství ve srovnání s dělícími se mikrogliemi nebo polydendrocyty (**obr. č. 7**; Anderova et al., 2011, Goritz et al., 2011). Během ischemie dochází k aktivaci samotných



Obrázek č. 7: Reaktivní glióza. Po ischemickém poškození dochází k aktivaci buněk imunitního systému (mikroglíí a makrofágů) a vzniku reaktivních astrocytů, které částečně vznikají z lokálních astrocytů a částečně z polydendrocytů (obrázek upraven z: http://www.springerimages.com/Images/Biomedicine/1-10.1007_978-3-540-29678-2_2010-0, http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Ischemic+Attack%2C+Transient&lang=1).

astrocytů, které se přeměňují na tzv. reaktivní astrocyty (Bye et al., 2011), u nichž dochází k produkci markerů typických pro tento reaktivní stav, nestinu a vimentinu (Alonso, 2005), a k tzv. hypertrofii, která se projevuje zvýšenou produkcí gliálního fibrilárního acidického proteinu (GFAP) a zvětšenými těly astrocytů (Pekny a Nilsson, 2005). Ačkoli při tomto procesu dochází u astrocytů ke zvýšení počtu silných výběžků produkujících GFAP, nedochází ke změnám v rozmístění a překryvu jejich domén, který by byl očekáván v souvislosti s otokem, který způsobuje jejich zvětšení (Wilhelmsson et al., 2006). Ačkoli existuje studie, která poukazuje na vznik reaktivních astrocytů z polydendrocytů (Alonso, 2005), jiné studie ukazují, že bez ohledu na typ poranění, většina reaktivních astrocytů pochází z lokálních astrocytů a nikoli z polydendrocytů (Komitova et al., 2011, Zawadzka et al., 2010).

2.2.3.4. Aktivace mikroglíí

V souvislosti s poraněním dochází k aktivaci imunitního systému, konkrétně k vzestupu a aktivaci mikroglíí (Hampton et al., 2004) a makrofágů, kteří se začnou v poškozené oblasti shromažďovat (Urrea et al., 2007). Aktivované mikroglie (a jejich vlivem také astroglíální buňky) produkují celou řadu prozánětlivých cytokinů, např. interleukiny IL-

1 β , IL-6 nebo nádorový nekrotický faktor α (TNF α), ale i indukovatelnou formu NO syntázy. Ačkoli aktivované mikroglie produkují prozánětlivé cytokiny, nepřispívají k tvorbě gliální jizvy, ale naopak snižují celkové množství produkovaného GFAP a vimentinu, což v konečném důsledku chrání CNS před tvorbou gliální jizvy (Rohl et al., 2007), která není žádoucí při obnově poraněné tkáně, neboť brání prorůstání buněk.

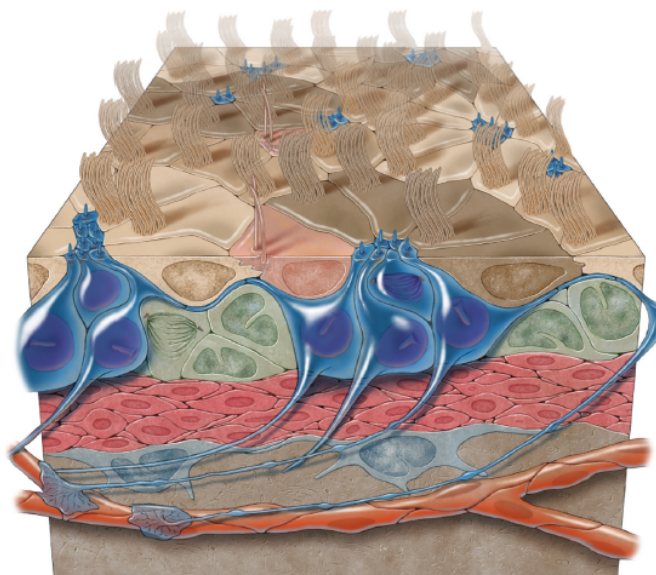
2.3. Regenerační procesy v CNS

Po několika dnech po ischemii dochází v CNS k reparačním procesům, které se snaží nahradit ztráty neuronálních a gliálních buněk v postižené oblasti CNS tvorbou nových buněk, tzv. neurogenezí a gliogenezí. Neurogeneze a gliogeneze jsou komplexní vývojové procesy, při kterých dochází k proliferaci, migraci a diferenciaci neurálních kmenových/progenitorových buněk (Fallon et al., 2000). V dospělém mozku probíhá neurogeneze a gliogeneze především ve dvou neurogenních oblastech, a to v SVZ (Ventura a Goldman, 2007) a v gyru dentatu hipokampu (Seri et al., 2004). V současné době se ukazuje, že gliogeneze probíhá také v oblastech, které nejsou primárně neurogenní (striatum, kortex). Gliogeneze v těchto ne-neurogenních oblastech zřejmě slouží k nahrazení odumřelých buněk v průběhu života organismu (Simon et al., 2011).

2.3.1. Základy pro vývoj neurogenních zón

Během embryonálního vývoje předního mozku vzniká populace radiálních glií, která se postupně rozděluje na dvě linie, a to dorzální a ventrální radiální glie. Radiální glie patří spolu s neuroepiteliálními buňkami a bazálními progenitory k prvním buňkám (Guillemot, 2005), které se vytvářejí během embryonálního vývoje v mozku. Tyto buňky jsou považovány za neurální kmenové buňky a v určitých oblastech mozku přetrvávají z embryonálního období a udržují si svou „kmenovost“ až do dospělosti (Anthony et al., 2004). Charakteristickou vlastností těchto kmenových buněk je schopnost dělit se, v rámci jednoho typu tkáně, do mnoha buněčných typů (tzv. multipotence) a zároveň schopnost vytvářet kopie sebe samých (Gage, 2000). Oproti tomu progenitorové buňky mohou být multipotentní nebo unipotentní (schopné dozrát do jednoho typu dospělé, zralé buňky) a mají omezenou schopnost vytvářet kopie sebe samých.

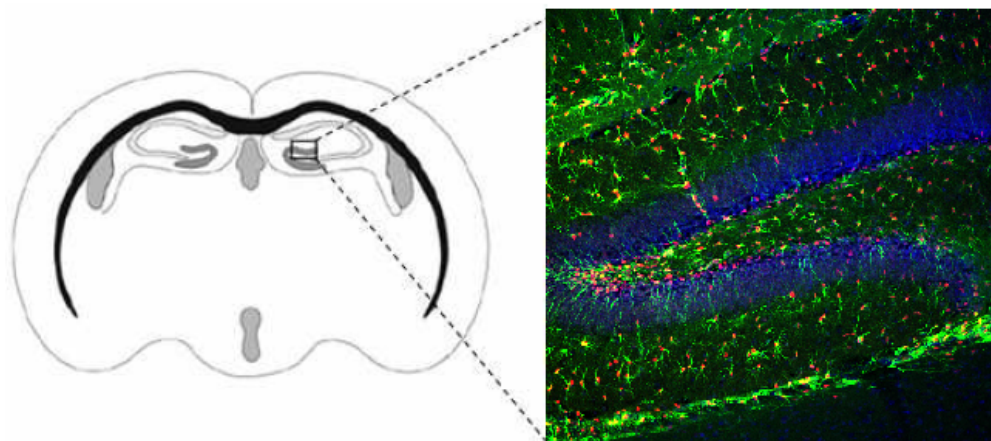
Radiální glie se v embryonální mozkové kůře vyskytují v zárodečné, tzv. germinální zóně, ze které vysílají radiální výběžky směrem k mozkové pleně pia mater. Tyto buňky mají typicky bipolární morfologii s nerozvětvenými výběžky, ale v některých případech tyto výběžky zatahují a dozrávají tak v jiný buněčný typ (Li et al., 2011a). Radiální glie mají v mozku několik úloh. Během vývoje navádějí jejich radiálně orientované výběžky nově vzniklé buňky do cílových míst. Krátce po narození však tyto zárodečné radiální glie mizí a jsou nahrazeny sekundárními radiálními gliemi, z nichž část slouží ke stejné funkci jako zárodečné radiální glie (například pro cílenou migraci buněk v gyru dentatu při neurogenezi v dospělém mozku) a jiná část se přeměňuje na astrocyty (Brunner et al., 2010). Astrocyty i neurony pravděpodobně vznikají z jedné subpopulace radiálních glií, které se odlišně vyvíjejí v určitých oblastech mozku a v různou dobu vývoje organismu (Anthony et al., 2004). Polydendrocyty a oligodendrocyty pak zřejmě vznikají z populace dorzálních radiálních glií (Ventura a Goldman, 2007). Astrocyty ventrikulární zóny (B-buňky) jsou v této oblasti (z níž postupně ve vývoji vzniká SVZ) organizovány do podoby větrníků (**obr. č. 8**), a to tak, že uvnitř kruhové oblasti tvořené ependymálními buňkami je vždy jedna a více B-buněk, ze kterých vznikají přechodně se dělící buňky, které dávají vzniku neuroblastům. B-buňky vytvářejí apikální kontakt s povrchem komor a na opačnou stranu svými výběžky tvoří patku, kterou se připojují ke krevní kapiláře (Mirzadeh et al., 2008).



Obrázek č. 8: Trojrozměrný model dospělé ventrikulární zóny. B-buňky se dotýkají dlouhými bazálními výběžky krevní kapiláry (oranžová), na které tvoří patku, a svým apikálním koncem povrhu komor. B- buňky jsou spolu s ependymálními buňkami uspořádány do podoby větrníků (světlá a tmavá hnědá barva). B-buňky (astrocyty ventrikulární zóny - modře), přechodně se dělící buňky - zeleně, neuroblasty – červeně (Mirzadeh et al., 2008).

2.3.2. Gyrus dentatus hipokampu

Hipokampální formace (zkráceně hipokampus) je struktura limbického systému, v níž se informace šíří přes několik oblastí: gyrus dentatus, CA3, CA2, CA1 oblast a subiculum. Při výstupu z hipokampu se dále šíří do entorinální kůry mozku.



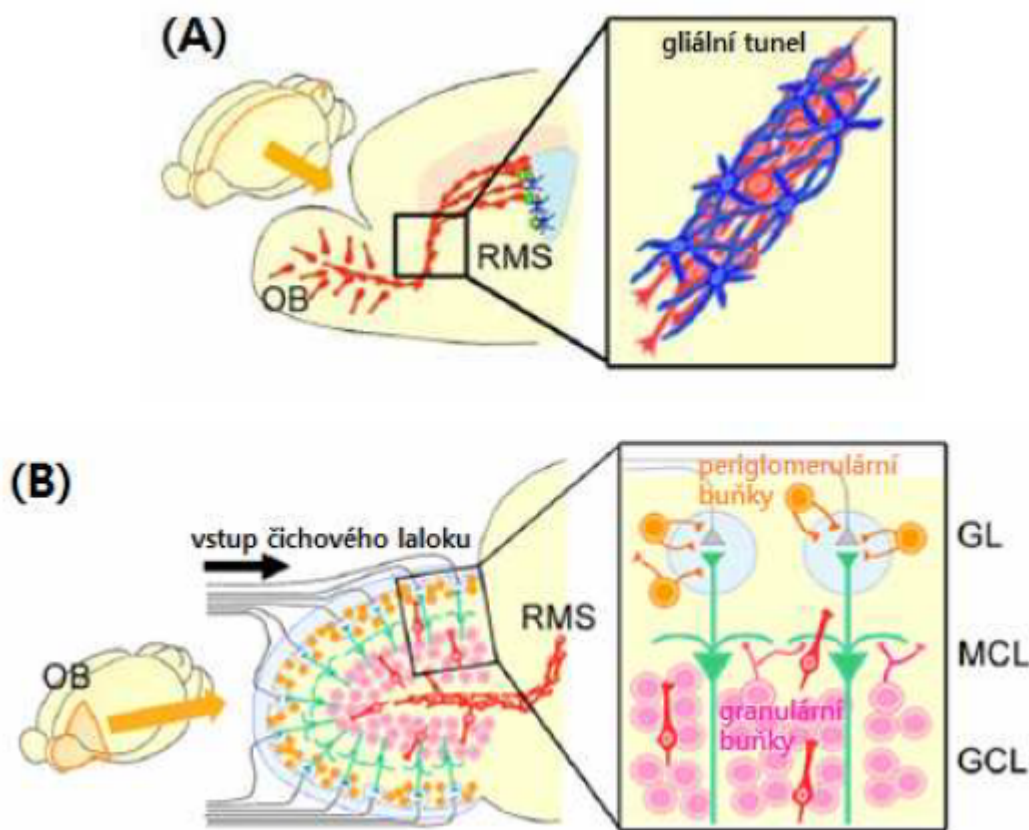
Obrázek č. 9: Gyrus dentatus hipokampu. Schéma koronárního řezu mozku (vlevo), na kterém je zvýrazněn detail gyru dentatu hipokampu, ve kterém probíhá neurogeneze (Seri et al., 2004; <http://www.functionalneurogenesis.com/blog/tag/dentate-gyrus/>).

Neurogeneze se v hipokampu omezuje téměř výhradně na gyrus dentatus (**obr. č. 9**; Liu et al., 2010), který sestává z několika vrstev. Nejníže je položena tzv. subgranulární zóna (SGZ), následuje granulární buněčná vrstva (GCL) a po ní molekulární vrstva (MCL). V SGZ se vyskytují dva typy astrocytů: radiální astrocyty a horizontální astrocyty. Horizontální astrocyty patří mezi astrocyty typu 2, mají kulaté nebo oválné tělo bez dlouhých výběžků, které jsou typické právě pro radiální astrocyty (astrocyty typu 1; Filippov et al., 2003). Radiální astrocyty patří mezi primární progenitory, ze kterých vznikají D1 buňky (mezistav mezi astrocyty a granulárními neurony), které svým dělením vytvářejí D2 buňky. Výběžky D2 buněk prorůstají ke granulární vrstvě gyru dentatu a během této cesty dozrávají přes stádium D3 do zralých granulárních neuronů (Seri et al., 2001, Seri et al., 2004). Jednotlivé granulární neurony pak vysílají signály směrem k interneuronům a pyramidálním neuronům. Astrocyty v SGZ jsou charakterizovány prostřednictvím GFAP, který během svého zrání do neuronů ztrácí a na svém povrchu začnou vytvářet markery typické pro neuronální linii (jako je DCX či MAP2; Liu et al., 2010). V průběhu tvorby granulárních neuronů vznikají také v menším množství diferencované astrocyty (Suh et al., 2007), které modulují synaptický

přenos a zajišťují homeostázu nervovým buňkám. V hilu gyru dentatu byly také objeveny polydendrocyty, jejichž funkce v této oblasti není prozatím známa (Filippov et al., 2003).

2.3.3. SVZ

SVZ je neurogenní oblast, která se nachází podél postranních stěn v postranních komorách mozku. Neurogenní potenciál této oblasti je dán přítomností B-buněk, které jsou GFAP pozitivní (Garcia et al., 2004) a které tu přetrvávají do dospělosti jako přímí potomci dorzálních radiálních glií (Anthony et al., 2004, Ventura a Goldman, 2007). SVZ se skládá ze čtyř typů buněk: endymálních buněk, které obecně vystylají stěny komor a jsou odlišitelné pomocí proteinového markeru vimentinu, dále z B-buněk, přechodně se dělících C-buněk a migrujících neuroblastů neboli A-buněk (**obr. č. 10**; Peretto et al., 1997). Zdrojem dospělé neurogeneze jsou B-buňky, které slouží jako progenitorové buňky (Garcia et al., 2004) a dělí se za vzniku C-buněk. C-buňky se dělí a mírně zrají a dávají tak vzniku A-buňkám, které putují rozšířením, které je formováno výběžky B-buněk pozitivních na proteinové markery GFAP a S100 β , které se nazývá rostrální migrační proud (RMS). Tímto rostrálním rozšířením migrují A-buňky, které se dělí a vytvářejí shluky několika buněk s typickou bipolární morfologií nezralých neuronů. A-buňky jsou rozpoznatelné pomocí neurální adhezivní molekuly PSA-NCAM (Peretto et al., 1997). Cílovou „stanicí“ těchto buněk je čichový lalok, kde dozrávají ve dva typy interneuronů: granulární a periglomerulární interneurony (Ventura a Goldman, 2007).



Obrázek č. 10: A) Migrace neuroblastů. Nově vzniklé neuroblasty v subventrikulární zóně putují směrem do čichového laloku (OB) prostřednictvím rostrálního migračního proudu (RMS). Neuroblasty (červené) vytvářejí shluky několika buněk, které jsou obklopeny gliálním tunelem tvořeným výběžky astrocytů (modré).

B) Neurogeneze v OB. V OB se neuroblasty rozšiřují radiálně a mění se ve dva typy čichových interneuronů: granulární a periglomerulární interneurony. Tyto buňky se nacházejí ve vrstvě granulárních buněk (GCL) nebo ve vrstvě glomerulárních buněk (GL).

MCL-vrstva mitrálních buněk (Kaneko a Sawamoto, 2009).

Všechny tyto výše uvedené poznatky byly zjištěny na zvířecím modelu myši resp. laboratorního potkana. Současné studie ukazují, že se tato neurogeneze vyskytuje i v lidském mozku, ve kterém je oproti mozku hlodavců, velmi málo vyvinutý čichový lalok (Curtis et al., 2007). V anteriorním rohu postranní komory se vyskytuje štěrbina, která obsahuje hojně se dělící buňky. Tato lidská SVZ se skládá ze čtyř vrstev buněk. Vrstva I přiléhá ke stěně komory a je tvořena vrstvou ependymálních buněk. K této vrstvě náleží vrstva II, jenž žádné buňky neobsahuje. Následuje vrstva III obsahující množství heterogenních buněk a vrstva IV, která je bohatá na myelin a odděluje SVZ od nucleus caudatus (Kam et al., 2009). Ve vrstvě

III a IV vznikají migrující neuroblasty (PSA-NCAM⁺ buňky s bipolární morfologií), které putují z těchto oblastí sestupnou částí RMS. Sestupná část se v určitém bodě stáčí a formuje rostrální lalok migračního proudu, který následně vstupuje do čichového laloku. Stejně jako u hlodavců, i v případě lidského mozku, tímto migračním proudem vstupují migrující neuroblasty do periglomerulární vrstvy čichového laloku (Curtis et al., 2007, Kam et al., 2009).

2.3.4. Indukce neurogeneze a gliogeneze v neurogenních nikách

Po ischemickém poškození dochází k aktivaci buněčné proliferace v obou neurogenních nikách (v gyru dentatu i v SVZ; Jin et al., 2001). Během 5 dnů po poranění dozrávají v těchto oblastech nově vzniklé buňky do oligodendrocytů nebo astrocytů, které částečně obklopují poškozenou oblast (Urrea et al., 2007). V SVZ poranění aktivuje buněčnou proliferaci nejen v hemisféře zasažené tímto poraněním, ale také v hemisféře nepoškozené. V gyru dentatu hipokampu naopak reaguje na poranění především poškozená hemisféra (Jin et al., 2001). Takto namnožené a nově vzniklé buňky vycestovávají z dorzolaterální oblasti SVZ a formují řetězce migrujících neuroblastů, které mají stejně jako v RMS bipolární morfologii. Tyto neuroblasty kontaktují přilehlé astrocyty, které je zřejmě navádějí směrem k peri-infarktové oblasti poranění. V poškozené oblasti migrující neuroblasty přežívají a dozrávají v neurony specifické pro danou oblast poškozeného mozku (Parent et al., 2002). Poranění také aktivuje astrocyty, které dediferencují (tzn., že se vrací do stádia, kdy jsou schopny proliferace) a dávají tak vzniku různým buněčným typům. Izolace buněk z poškozené oblasti a jejich následná kultivace *in vitro* za přítomnosti příslušných faktorů prokázala, že jsou tyto buňky schopné tvořit neurony, astrocyty i oligodendrocyty (Buffo et al., 2008).

Pro náhradu buněk zaniklých v poškozené oblasti se uvažuje také o možnosti transplantace neurálních kmenových nebo progenitorových buněk právě do míst poškození. Tyto buňky jsou vhodnými kandidáty pro transplantace zejména proto, že nevykazují žádné imunogenní chování, i když jsou kultivovány spolu s tkání z jiného živočišného druhu. Nedochází tudíž k aktivaci imunitního systému hostitele a k hojení transplantované tkáně (Klassen et al., 2003). Po vnesení neurálních kmenových buněk, které byly izolovány ze SVZ do oblasti ischemické penumbry v bílé hmotě mozkové kůry došlo k tomu, že buňky z místa

svého vnesení cestovaly směrem do míst, kde následkem poranění došlo ke ztrátě buněk, a byly schopny v této oblasti dozrávat v astrocyty a oligodendrocyty (Sun et al., 2011).

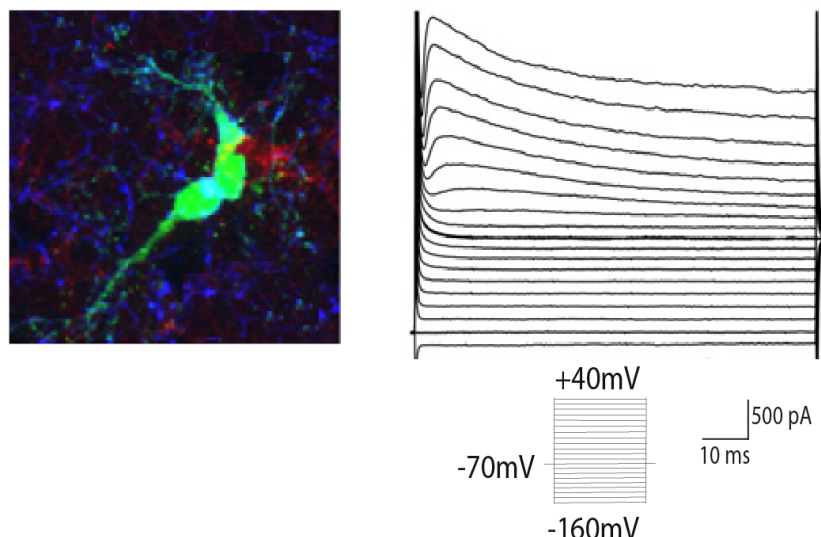
2.3.5. Ne-neurogenní oblasti

Neurogeneze v dospělém mozku, v oblastech, které nejsou neurogenní (kortex, striatum), za fyziologických podmínek prakticky neexistuje. Může být však vyvolána nějakým podnětem, jako je například poranění. Tato podmínka částečně platí, ale i neplatí pro polydendrocyty, které se za normálních podmínek v nepoškozeném mozku dělí a dozrávají pouze v jeden typ buněk – oligodendrocyty (Dimou et al., 2008) a poranění mění jejich vlastnosti a stimuluje je k dělení (Simon et al., 2011).

2.3.6. Polydendrocyty

V poslední době se ke třem základním typům gliálních buněk, astrocytům, oligodendrocytům a mikroglíím řadí ještě čtvrtý gliální typ, tzv. polydendrocyty. Tyto buňky byly poprvé identifikovány na začátku 90. let (Stallcup a Beasley, 1987) a jejich názvy jako NG2 glie, O2-A prekursorů nebo prekursorové buňky oligodendrocytů korespondují s některými jejich vlastnostmi. Polydendrocyty zřejmě slouží jako prekursorové buňky oligodendrocytů, ale jejich přesná úloha v CNS není zatím plně objasněna (Zhu et al., 2008). V dospělém mozku existují dvě morfologicky odlišné populace polydendrocytů, které se vyskytují buď v bílé, nebo šedé hmotě mozku (De Biase et al., 2010, Wu et al., 2005).

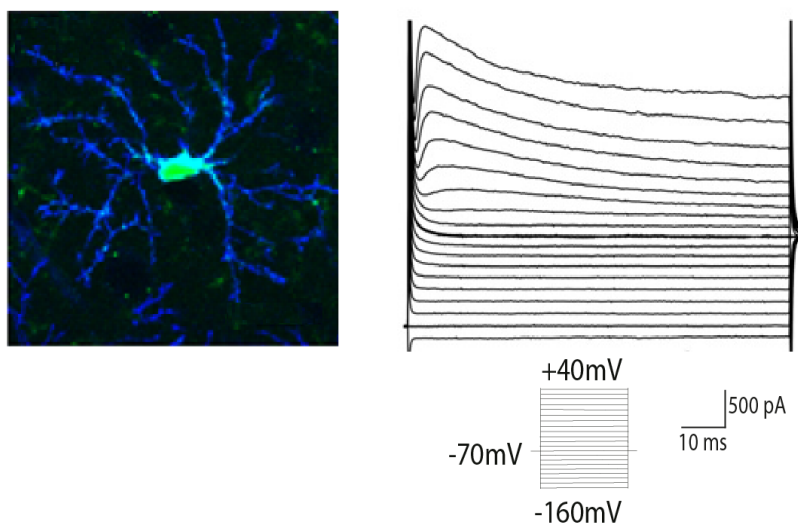
Polydendrocyty bílé hmoty mají několik málo výběžků, které vybíhají z opačné strany buněčného těla, tzv. bipolární morfologii (**obr. č. 11**; Wu et al., 2005), typickou pro prekursorové buňky oligodendrocytů. V bílé hmotě leží polydendrocyty v těsné blízkosti myelinizovaných axonů a zřejmě z tohoto důvodu mají podlouhlé buněčné tělo, ze kterého vystupují výběžky, které se vinou podél myelinizovaných axonálních svazků (Dawson et al., 2003). Tyto buňky se vyznačují průměrnou hodnotou klidového membránového potenciálu



Obrázek č. 11: Typická bipolární morfologie a elektrofyziologická charakteristika polydendrocytů bílé hmoty (na obrázku dvě buňky vedle sebe (Pivonkova et al., 2010, Zhu et al., 2011b).

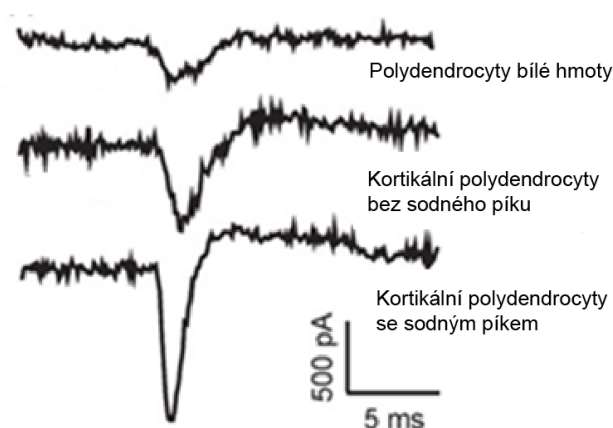
~ -70 mV, kapacitancí membrány přibližně 8 pF a vyšší hodnotou membránového odporu ve srovnání s polydendrocyty šedé hmoty. Dále vykazují K_{DR} proudy, dovnitř usměrněné napětově závislé K^+ proudy (K_{IR}) a rychle se aktivující a inaktivující vně usměrněné napětově závislé K^+ proudy (K_A), které mají průměrně nižší hodnotu (v případě K_{IR} téměř nulovou) než stejné proudy u polydendrocytů šedé hmoty kůry (Chittajallu et al., 2004).

Polydendrocyty šedé hmoty se vyznačují jedním až dvěma proximálními výběžky, které se na svých koncích rozbíhají do mnoha jemných vláken. V šedé hmotě leží polydendrocyty mezi buněčnými těly neuronů a svými radiálně vybíhajícími výběžky obklopují oblasti, kde se neurony mezi sebou navzájem spojují. Díky tomu mají tyto buňky typicky „hvězdovitý“ tvar (**obr. č. 12**; Dawson et al., 2003). Průměrná hodnota klidového



Obrázek č. 12: Typická morfologie a elektrofyziologická charakteristika polydendrocytů šedé hmoty (Pivonkova et al., 2010, Zhu et al., 2011b).

membránového potenciálu polydendrocytů šedé hmoty je přibližně -87 mV a kapacitance membrány je 40 pF. Tyto buňky vykazují pasivní proudy a v hojné míře K_{DR} , K_{IR} a K_A proudy (Chittajallu et al., 2004). Velká část polydendrocytů bílé nebo šedé hmoty produkuje tetrodotoxin (TTX) - sensitivní I_{Na} (De Biase et al., 2010), které se liší od I_{Na} neuronů. I_{Na} produkovaný subpopulací kortikálních polydendrocytů má podobu jediného hrotu, který je aktivován při více depolarizované hodnotě membránového potenciálu (**obr. č. 13**) ve srovnání s I_{Na} píky aktivovanými v neuronech (Chittajallu et al., 2004). Na rozdíl od neuronů, polydendrocyty většinou netvoří akční potenciál (De Biase et al., 2010, Chen et al., 2008).

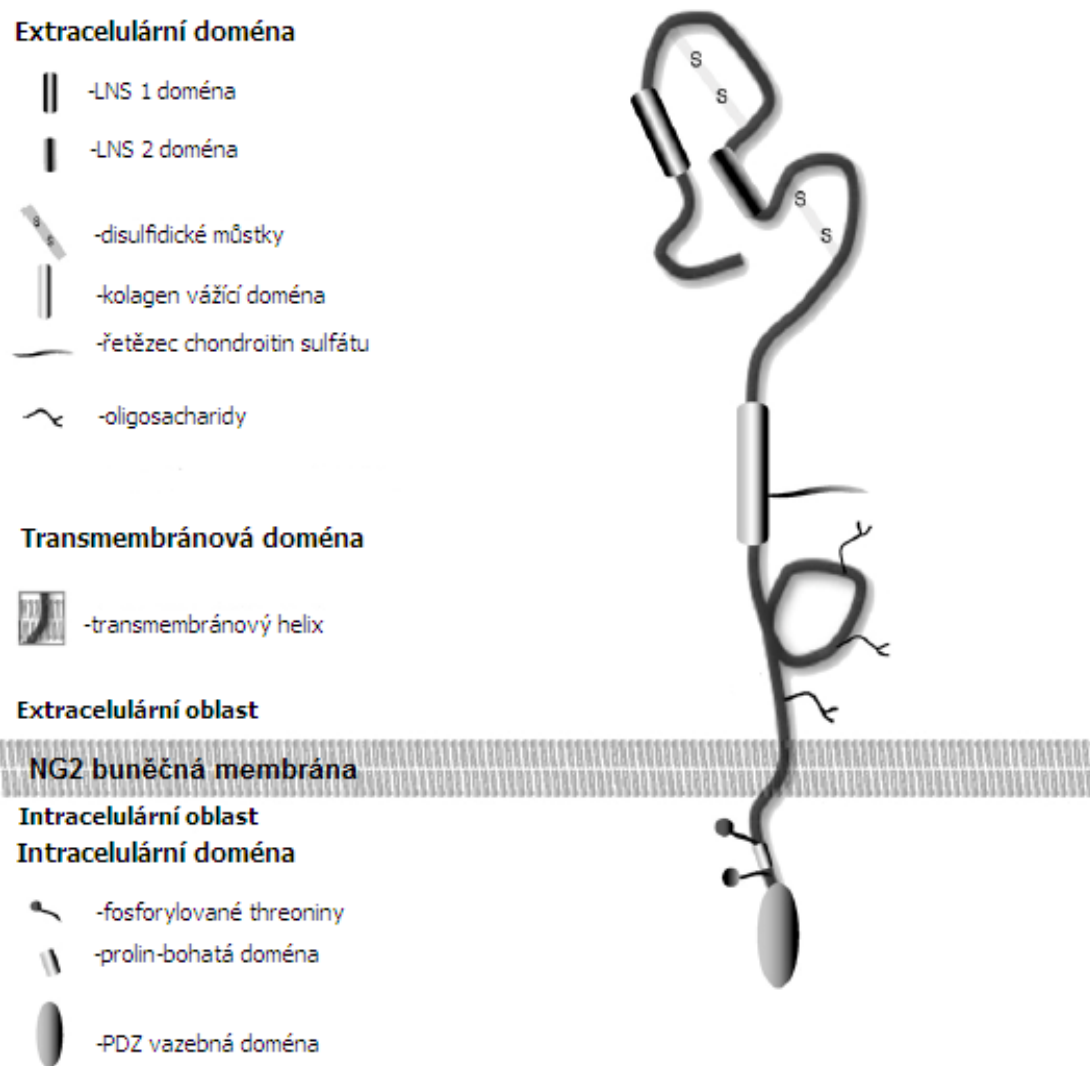


Obrázek č. 13: Rozdíly ve velikosti sodného píku mezi jednotlivými subpopulacemi polydendrocytů (Chittajallu et al., 2004).

Polydendrocyty se obvykle vyskytují ve shlucích dvou až tří dceřiných buněk, které pocházejí z jedné mateřské buňky. Tvoří často synapse nejen mezi sebou navzájem, ale také s jinými buňkami. Například v mozečku se polydendrocyty vyskytují v těsné blízkosti Bergmanových glií (radiální glie) a svými výběžky kontaktují v horizontální a vertikální rovině primární vlákna těchto glií. Dále se vyskytují v těsné blízkosti protoplasmatických astrocytů (Leoni et al., 2009) a neuronů, se kterými tvoří hojně synapse (Butt et al., 1999).

2.3.6.1. *Imunocytochemické markery polydendrocytů*

Jedním z názvů polydendrocytů (jak již bylo zmíněno výše) jsou i NG2 glie. Toto označení získaly podle svého prvního identifikovaného antigenu, který byl objeven na buňkách, které vykazovaly vlastnosti jak neurálních, tak gliálních buněk. Z těchto vlastností byl proto odvozen název neurálního/gliálního antigenu 2 (NG2; Stallcup a Beasley, 1987). Chondroitin sulfát proteoglykan neboli NG2 protein je molekula extracelulární matrix, která patří do rodiny neurexinů. Její amino konec je tvořen dvěma doménami, které tvoří velkou extracelulární doménu, která se skládá ze tří částí: lamininu G, neurexinu a pohlavní hormon vázajícího globulinu (tzv. LNS doména). NG2 protein dále obsahuje transmembránovou doménu a intracelulární C-terminální konec, který obsahuje speciální doménu a několik threoninových skupin (**obr. č. 14**), které jsou přístupné fosforylaci a mohou být tak regulovány (Trotter et al., 2010).



Obrázek č. 14: Schematický obrázek NG2 proteoglykanu a jeho vazebných domén (Trotter et al., 2010).

V počátcích výzkumu byl NG2 proteoglykan považován za hlavní marker polydendrocytů, ale následným zkoumáním bylo zjištěno, že se vyskytuje i na jiném buněčném typu, pericytech. Pericyty jsou buňky s mnoha výběžky, které se vyskytují kolem krevních kapilár. Jediným spolehlivým způsobem, jak odlišit tyto buňky od polydendrocytů je použití dvou receptorových markerů. Pro polydendrocyty se využívá receptoru růstového faktoru α odvozeného od krevních destiček (PDGFR α), který se vyskytuje na membráně polydendrocytů a který se ztrácí spolu s jejich dozráváním do dospělých oligodendrocytů (De Biase et al., 2010, Rivers et al., 2008). Na pericytech se PDGFR α sice vyskytuje také, ale tyto buňky produkují další receptor nazývaný receptor růstového faktoru krevních destiček β

(PDGFR β), který se už na polydendrocytech nevyskytuje. Navíc jsou tyto dva buněčné typy od sebe dobře odlišitelné morfologicky (Goritz et al., 2011, Zhu et al., 2008)

2.3.6.2. *Výskyt polydendrocytů a jejich populace v dospělém nepoškozeném mozku*

V dospělém nepoškozeném mozku jsou polydendrocyty rovnoměrně rozmístěny v bílé i šedé hmotě CNS. V bílé hmotě tvoří tyto buňky 8-9 %, v šedé hmotě pouhých 2-3 % z celkového počtu buněk. I přes své poměrně nízké zastoupení, reprezentují polydendrocyty skupinu buněk, která se v dospělém mozku nejvíce dělí, a to i s přibývajícím věkem organismu. Z celkového počtu dělících se buněk v dospělém mozku pokrývají polydendrocyty na počátku života jedince až 74 %. Toto číslo během několika dalších měsíců trochu klesá, dokud se neustálí na hodnotě okolo 66 %, která se už během dalšího života příliš nemění (Dawson et al., 2003).

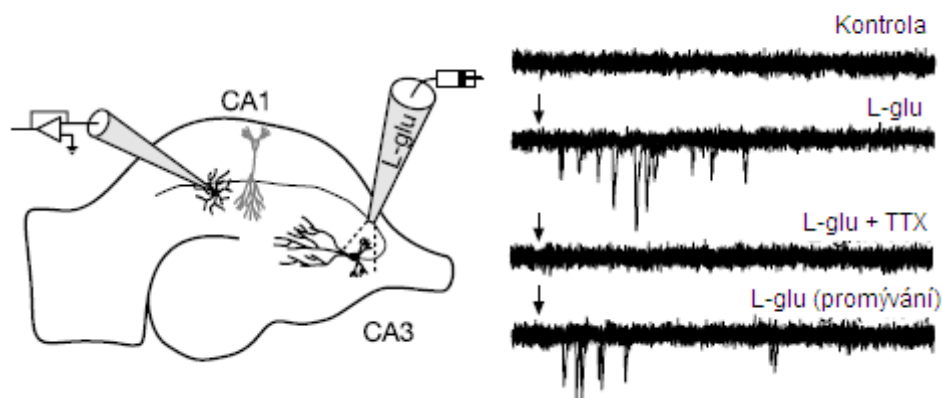
V bílé hmotě raně postnatálního mozku existují dvě odlišné populace polydendrocytů. Početnější populace exprimuje napětově ovládané Na⁺ kanály a napětově ovládané K⁺ kanály. Zastoupení těchto dvou populací se vyvíjí s postupem času. Zatímco 7 dní po narození se u 50 % polydendrocytů vyskytuje populace s napětově ovládanými kanály a u zbylých 50 % se kanály nevyskytují, 12 dní po narození se populace s kanály zvýší na 70 % a zbylých 30 % připadá na populaci polydendrocytů bez kanálů. Obě subpopulace polydendrocytů mají podobné morfologické vlastnosti (velikost jádra, počet výběžků atd.), takže je od sebe nelze morfologicky odlišit a s velkou pravděpodobností se jedná o buňky ve stejném vývojovém stádiu. Obě skupiny buněk jsou schopné proliferace a exprimují na svém povrchu NG2 proteoglykan a transkripční faktor oligodendrocytů 2 (Olig2). Polydendrocyty můžeme dělit do několika subpopulací např. na základě přítomnosti Na⁺ kanálů nebo NMDA receptorů. Polydendrocyty s NMDA receptory reagují citlivěji na zvýšený výlev glutamátu, ke kterému dochází v důsledku ischemického poškození, což vede k jejich úmrtí (Karadottir et al., 2008). Další dělení vymezuje polydendrocyty na základě přítomnosti proteinového markeru DCX a nestinu, které se vyskytují u přibližně poloviny polydendrocytů v neokortexu. Subpopulace polydendrocytů, která DCX neexprimuje dozrává výhradně do oligodendrocytů, z čehož vyplývá, že právě tyto buňky slouží jako prekursor oligodendrocytů (Tamura et al., 2007, Tanaka et al., 2009).

2.3.6.3. *Výskyt polydendrocytů v neurogenních nikách*

Vzhledem k tomu, že polydendrocyty patří k buňkám, které se v dospělém nepoškozeném mozku nejvíce dělí (Dawson et al., 2003), dalo by se očekávat, že se také budou podílet na produkci buněk v neurogenních nikách (SVZ a gyru dentatu hipokampu). Ačkoli některé studie naznačují, že C-buňky vyskytující se v SVZ jsou ve skutečnosti polydendrocyty (Aguirre et al., 2004), nejnovější studie ukazují, že se v SVZ nevyskytují žádné buňky vzniklé z polydendrocytů, které by byly pozitivní na imunocytochemické markery zralých neuronů nebo zralých astrocytů. Navíc se polydendrocyty v SVZ vyskytují jen ve velmi nepatrném množství oproti ne-neurogenním oblastem (0,15 % v SVZ oproti 2,81 % v ne-neurogenních oblastech). Přesto zde, i přes svůj malý počet, nějakou úlohu mají. Při tvorbě A-buněk z C-buněk, polydendrocyty kontaktují tyto buňky a s postupujícím zráním A-buněk do dospělých granulárních a periglomerulárních neuronů zvyšují počet synapsí, jimiž s těmito buňkami komunikují (Komitova et al., 2009, Rivers et al., 2008).

2.3.6.4. *Polydendrocytické synapse*

Jak bylo vidět u SVZ, polydendrocyty hojně vytvářejí synapse, kterými komunikují s ostatními buňkami. V raných stádiích vývoje nejprve vytvářejí synapse s neurony (De Biase et al., 2010), které zůstávají zachovány až do dospělosti. Tyto synapse s polydendrocyty získávají excitační vstupy z Schafferových kolaterál (**obr. č. 15**), což jsou souběžné axony pyramidálních neuronů, které vybíhají z CA3 oblasti hipokampu a napojují se (kromě polydendrocytů) především na pyramidální neurony CA1 oblasti (Bergles et al., 2000). Na axonech těchto neuronů se vyskytují funkčně specializované membránové oblasti, které vytvářejí mikrodomény, na kterých se v těsné blízkosti vyskytují napětově ovládané vápníkové kanály a vápníkové senzory. Vápníkové senzory (receptory) váží tři vápníkové ionty a jejich aktivací dochází k fúzi váčků, které jsou shromážděny těsně pod axonální membránou a jsou naplněné excitační aminokyselinou glutamátem. Axonální vlákna neuronů jsou schopna rychle znovu obnovit váčky ztracené při kvantovém výlevu glutamátu, a to vychytáním vylitého glutamátu ze synaptické štěrbin prostřednictvím endocytózy (Kukley et al., 2007). Po fúzi váčků se vylitý glutamát váže a aktivuje AMPA receptory přítomné na polydendrocytech (Bergles et al., 2000), což může vést až k tvorbě akčních potenciálů, pro něž je typická, v porovnání s neurony, malá amplituda (Ziskin et al., 2007). Aktivací AMPA receptorů dochází ke vstupu vápníku do buňky. Vápník aktivuje ERK1/2 kinázu, což je



Obr. č. 15: Synaptický přenos mezi neurony CA3 oblasti a polydendrocyty. Aplikace L-glutamátu (L-glu) na CA3 pyramidální neurony generuje akční potenciály na CA1 neuronech, ale i polydendrocytech. Tyto akční potenciály vymizely po aplikaci tetrodotoxinu (TTX), který selektivně inhibuje sodný proud (Bergles et al., 2000).

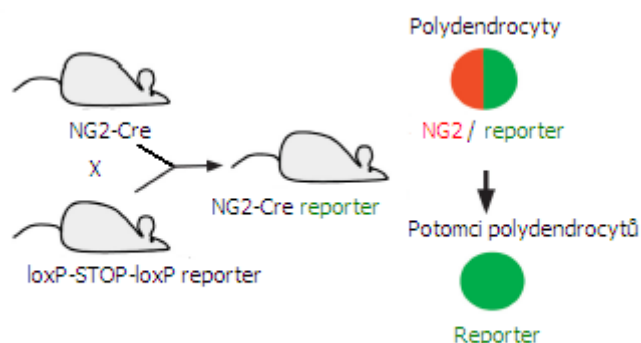
mitogenem-aktivovaná protein kináza (MAP kináza), která je v buňce zodpovědná za fosforylaci příslušných proteinů (Hamilton et al., 2009). Tím, že jsou polydendrocyty v těsné blízkosti s neurony ovlivňují a modulují tímto způsobem synaptický přenos (Bergles et al., 2000).

2.3.6.5. *Proliferace a diferenciace polydendrocytů*

V dospělém nepoškozeném mozku podstupují polydendrocyty symetrické dělení (Zhu et al., 2008), při kterém část těchto buněk dozrává do dospělých oligodendrocytů, zatímco větší část zůstává polydendrocyty (Guo et al., 2009). Je to proto, že polydendrocyty procházejí velmi dlouhým buněčným cyklem, který trvá 37 dní. Po S, G2 a M fázi, které společně trvají asi 5 dní, polydendrocyt vstupuje do prodloužené G1 fáze a v ní setrvává po zbytek buněčného cyklu. Ukazuje se, že takto dlouhá doba buněčného cyklu je pouze odrazem klidového stavu polydendrocytů, který zaujímají v nepoškozeném dospělém mozku. V případě potřeby značná část populace znovu vstupuje do tohoto cyklu a je schopna *in vivo* nejméně dvou dělení (Simon et al., 2011). Tím, že polydendrocyty vytvářejí synapse s okolními buňkami (Bergles et al., 2000), nejen ovlivňují vlastnosti těchto buněk, ale i tyto buňky mohou ovlivňovat polydendrocyty. Bylo zjištěno, že aktivace glutamátových receptorů, zvýšená koncentrace vnitrobuněčného sodíku nebo depolarizace membrány

polydendrocytů, vede k inhibici draslíkových proudů, což v konečném důsledku inhibuje buněčnou proliferaci polydendrocytů a podporuje jejich zrání do oligodendrocytů (Knutson et al., 1997).

Při studiu polydendrocytů se stávala více palčivou otázka, k jaké funkci ve skutečnosti tyto buňky slouží. Studie polydendrocytů prováděné *in vitro* a *in vivo* totiž podávají velmi odlišné výsledky. Zkoumání polydendrocytů *in vivo* je obvykle založeno na genetickém mapování pomocí Cre/loxP technologie. Tato metoda je založena na tvorbě myši, která je geneticky upravena tak, aby vytvářela Cre rekombinázu, která je exprimována pod promotorem určitého genu (např. pro GFAP nebo NG2 proteoglykan). Tato myš je pak zkřížena s reporterovou myší, která nese specifickou sekvenci, na níž je navázaný zesílený zelený fluorescenční protein EGFP. Vzniklý potomek produkuje ve všech buňkách, které mají aktivní příslušný gen (např. pro GFAP nebo NG2 proteoglykan), EGFP (**obr. č. 16**; Garcia et al., 2004). Tato metoda umožňuje sledovat osudy jednotlivých potomků vzniklých z těchto buněk (například polydendrocytů).



Obrázek č. 16: Cre/loxP technologie genetického mapování, která umožňuje sledování všech potomků vzniklých z buněk, které mají aktivní promotor pro NG2 proteoglykan (čili polydendrocytů; Garcia et al., 2004).

V perinatálním a v raně postnatálním vyvíjejícím se mozku slouží polydendrocyty jako prekursor oligodendrocytů (Zhu et al., 2008). V těchto vývojových stádiích se polydendrocyty rychle symetricky dělí a produkují dva dceřiné polydendrocyty, které dozrávají v jeden nebo dva dospělé myelinizující oligodendrocyty (Zhu et al., 2011b), které vysílají myelinizující výběžky v bílé i v šedé hmotě CNS. V bílé hmotě, konkrétně v corpus callosum, ve které se tvoří dvakrát více oligodendrocytů vzniklých z polydendrocytů než v hmotě šedé, myelinizují oligodendrocyty vlákna mnoha neuronálních axonů, která jsou

s nimi v kontaktu. V šedé hmotě (neokortexu) jsou oligodendrocyty rozptýleny více izolovaně a vysílají velké množství myelinizujících výběžků (Zhu et al., 2011b). V kortexu dospělého mozku dozrávají obecně pouze dvě třetiny mitoticky aktivních polydendrocytů do oligodendrocytů. Zbylé buňky setrvávají ve formě „tichých“, mitoticky neaktivních polydendrocytů (Simon et al., 2011). Tím se polydendrocyty rozdělují na dvě buněčné populace, dělících se a nedělících se polydendrocytů (Rivers et al., 2008). Ale i přes toto snížené dělení, které probíhá univerzálně v bílé i šedé hmotě, polydendrocyty produkují až jednu třetinu nově vzniklých oligodendrocytů v corpus callosum dospělého mozku (Zhu et al., 2011b), které jsou schopny vyvářet novou kompaktní myelinovou pochvu (Zawadzka et al., 2010).

Zda mají polydendrocyty potenciál vytvářet zralé astrocyty, není prozatím dokonale prozkoumáno. Guo a spoluautoři ukazují, že *in vivo* mají polydendrocyty schopnost diferencovat do protoplasmatických astrocytů. Dokonce se zdá, že se tento typ astrocytů v šedé hmotě za fyziologických podmínek normálně vytváří, a to jak v raných stádiích vývoje, tak i v dospělosti. Nově vzniklé protoplasmatické astrocyty postupně vytvářejí spojení s krevním řečištěm, přes které zajišťují udržování homeostázy (Guo et al., 2009). Nejnovější studie provedená na transgenních myších s fluorescenčně označeným NG2 proteoglykanem ukazuje, že k tvorbě protoplasmatických astrocytů dochází pouze ve ventrálním předním mozku (Zhu et al., 2008) v pozdních embryonálních stádiích, nikoli však v postnatálním mozku (Zhu et al., 2011b). Při kultivacích fluorescenčně značených polydendrocytů *in vitro* si tyto buňky buď zachovávaly své vlastnosti i morfologii, nebo v menší míře dozrávaly v prvních stádiích kultivace do oligodendrocytů (4. – 7. den kultivace). Počátkem 4. dne se začínaly vyskytovat polydendrocyty, které svou morfologií připomínaly protoplasmatické astrocyty, které byly mimo jiné GFAP pozitivní. Po sedmi dnech kultivace bylo nalezeno velké množství GFAP pozitivních buněk, které exprimovaly také NG2 proteoglykan (Leoni et al., 2009). Další kultivací docházelo ke ztrátě NG2 proteoglykanu, který byl (u GFAP pozitivních buněk) zcela potlačen 11. dnem kultivace. Podíl GFAP pozitivních buněk nakonec dosáhl až 20 % celkového počtu buněk, které byly pozitivní na zelený fluorescenční protein (GFP). Současný výzkum naznačuje, že astrocyty vzniklé z polydendrocytů patří především k protoplasmatickým astrocytům. Některé faktory, jako například kostní morfogenetický faktor (BMP), mohou ovlivnit přeměnu polydendrocytů také do fibrózních astrocytů (Kondo a Raff, 2000).

Cílenou diferenciací *in vitro* bylo dokázáno, že v médiu podporujícím tvorbu neuronů, jsou polydendrocyty schopny dozrávat také do neuronů (Belachew et al., 2003). Pro dozrávání polydendrocytů do neuronů je nutná přítomnost FBS (Kondo a Raff, 2000), v němž kostní morfogenetický faktor BMP, konkrétně BMP-2 a BMP-4, které patří do rodiny transformujících růstových faktorů β (TGF β s), ovlivňoval přeměnu polydendrocytů do neuronů. Tento faktor se váže na své receptory BMPR I, Ib a II, které se na polydendrocytech vyskytují v hojné míře (Hu et al., 2010). Ačkoli *in vitro* dochází ke vzniku neuronů z polydendrocytů (Belachew et al., 2003, Kondo a Raff, 2000), nezdá se, že by se jednalo o přirozený stav, čemuž nejnovější studie *in vivo* nenasvědčují (Kang et al., 2010, Zhu et al., 2011b). Studie, které poukázaly na dozrávání polydendrocytů do neuronů, objevily takto vzniklé neurony v několika oblastech. V anteriorní piriformní kůře (primární čichový kortex) dospělého mozku vznikalo z polydendrocytů velké množství postmitotických neuronů, které měly velká těla s dlouhými axonálními výběžky. Morfologicky připomínaly projekční neurony, jejichž axony směřovaly k piálnímu povrchu (Rivers et al., 2008). Další oblastí byl hipokampus raně postnatálního a dospělého mozku. Zde byly neurony vzniklé z polydendrocytů schopny generovat i akční potenciály. Jednalo se konkrétně o GABAergní interneurony (GABA – gama-aminomáselná kyselina; Belachew et al., 2003). Guo a spoluautoři dále prokázali, že neurony vznikají také v amygdale, hypotalamu a v dorsálním a ventrálním kortexu, kde se jednalo konkrétně o glutamatergní pyramidální neurony (Guo et al., 2009).

2.3.7. Indukce neurogeneze a gliogeneze v ne-neurogenních oblastech

Poranění indukuje neurogenezi a gliogenezi také v ne-neurogenních oblastech, jako je thalamus, corpus callosum, kortex nebo striatum. Tato neurogeneze dosahuje svého maxima mezi prvním a druhým týdnem po poranění (Bye et al., 2011). Ačkoli bylo zjištěno, že poranění v těchto oblastech spouští neurogenezi, nově vzniklé buňky (například ve striatu) pocházejí především z progenitorových buněk SVZ. Tyto buňky ve striatu dozrávají do nových cholinergních a GABAergních neuronů, které jsou schopny vytvářet synaptické struktury a formovat tak funkční synapse s již existujícími neurony (Hou et al., 2008).

2.3.7.1. *Vliv poranění na vlastnosti polydendrocytů*

Mezi první buňky, které aktivují svou proliferaci po poranění (mimo buňky imunitního systému) patří právě polydendrocyty. Během prvních tří dnů po poranění dochází k aktivaci „tichých“ polydendrocytů, které rychle znovu vstupují do buněčného cyklu (Simon et al., 2011). Tato proliferace je následována aktivací a dělením astrocytů (Alonso, 2005). Během své aktivace získávají polydendrocyty morfologii tzv. reaktivních polydendrocytů, pro kterou jsou typické silné výběžky a zvýšená exprese NG2 proteoglykanu (Komitova et al., 2011). NG2 chondroitin sulfát proteoglykan patří do skupiny proteoglykanů, které mají inhibiční vliv na růst buněk. Ke zvýšené expresi NG2 proteoglykanu dochází právě v souvislosti s tvorbou gliální jizvy. Tento proteoglykan se dále vyskytuje ve velkém množství v oblasti jádra a penumbry poranění, a také na povrchu krevního řečiště. Ačkoli je jasné, že gliální jizva funguje jako fyzická bariéra a brání růstu axonů do míst poškození, není zatím zcela jasné, zda má NG2 proteoglykan inhibiční vliv na prorůstání axonů. Některé studie ukázaly, že neutralizace NG2 proteoglykanu pomocí protilátek umožňuje neuronálním axonům prorůst do nekrotického jádra a penumbry poranění (Tan et al., 2006). Na druhou stranu jiná studie ukázala, že ani vyšší množství NG2 proteoglykanu (vyšší než se vyskytuje přirozeně po poranění) nezpůsobilo odklon růstu neuronálního výběžku (Yang et al., 2006).

V poslední době se také ukazuje potenciální vliv Olig2 na dozrávání polydendrocytů do různých buněčných typů. Po poranění kortexu dochází (jak již bylo zmíněno) k masivnímu dělení Olig2 pozitivních buněk, které produkují NG2 proteoglykan, čili polydendrocytů. Krátce po tomto dělení následuje přesun Olig2 z jádra do cytoplasmy. Tento přesun je doprovázen postupnou ztrátou NG2 proteoglykanu. Buňky, u kterých došlo k translokaci Olig2 z jádra do cytoplasmy, dozrávaly do astrocytů. Naopak buňky, u nichž Olig2 zůstal lokalizován v jádře (asi 80 % všech buněk), dozrávaly do oligodendrocytů (Komitova et al., 2011, Zhao et al., 2009).

3. Cíle práce

Cílem této práce bylo objasnění vlivu růstových faktorů a morfogenů, které se prokazatelně uvolňují po ischemickém poškození, na diferenciační potenciál polydendrocytů. Dále jsme studovali vliv ischemického poškození na diferenciační potenciál těchto buněk. Vliv faktorů a ischemického poškození byl posuzován z hlediska fenotypových změn (základní proteinové markery neuronálních a gliálních buněk), a také z hlediska změn v membránových vlastnostech zkoumaných buněk.

- Charakterizace EGFP pozitivních buněk izolovaných z kmene myší B6;FVB – Tg(Cspg4-cre)1Akik/J.
- Objasnění diferenciačního potenciálu Cspg4/EGFP buněk v přítomnosti faktorů a morfogenů (bFGF, BDNF, Shh a VEGF) v *in vitro* podmínkách.
- Objasnění diferenciačního potenciálu Cspg4/EGFP buněk izolovaných z ischemického poškození po MCAO v *in vitro* podmínkách.
- Zhodnocení vlivu vybraných faktorů a morfogenů (bFGF, BDNF, Shh a VEGF) a MCAO na membránové vlastnosti *in vitro* kultivovaných buněk.

4. Materiál a metody

4.1. Původ buněk

Pro buněčné kultury byly použity buňky izolované z kmene myši B6;FVB – Tg(Cspg4-cre)1Akik/J;ZEG, které vznikly křížením hemizygotní NG2creBAC transgenní myši s reportérovým kmenem Z/EG myši. NG2creBAC transgenní kmen je geneticky upravený tak, že je do něj vložena sekvence kódující Cre rekombinázu, která je připojena za promotor určitého genu (v našem případě genu pro NG2 proteoglykan) (Zhu et al., 2008). Po zkřížení této transgenní myši s reporterovou Z/EG myši, která v sobě nese sekvenci pro EGFP a beta galaktozidázu, dojde k vyštěpení DNA sekvence pro beta galaktozidázu a k aktivaci exprese EGFP, což umožní trvalou expresi EGFP ve všech buňkách, které během svého vývoje měly aktivní gen pro NG2 proteoglykan. Tím je umožněno sledovat osudy všech potomků vzniklých právě z těchto buněk. Účinnost rekombinace je pro buňky předního mozku 86%. Všechny použité kmeny myši byly získány z Jackson Laboratory, Maine, USA.

4.2. Genotypování myši

Pro určení, které myši nesou úsek DNA pro Cre rekombinázu, bylo provedeno genotypování myši. Každé myši byl odebrán 1 až 1,5 cm dlouhý kus ocasu a z něj byly odříznuty tři 0,5 až 1 mm široké řezy. Ty byly vloženy do mikrotitrační destičky a fixovány 10 minut ve směsi 2% formaldehydu a 0,2% glutaraldehydu. Vytvořením směsi pufru složené z 200 mM MgCl₂, 400 mM K₃Fe(CN)₆ a 400 mM C₆FeK₄N₆·3H₂O, 20 µg X-galu (C₁₄H₁₅BrClNO₆) a 10 mM fosfátového pufru obohaceného o 150 mM NaCl (PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) byl připraven barvicí roztok a z něj do každé jamky aplikováno 100 µl. Mikrotitrační destička s těmito vzorky byla inkubována půl hodiny ve vodní lázni o teplotě 37°C. Pokud byly vzorky pozitivní na přítomnost β-galaktosidázového proteinu, zbarvily se do modra. Z takto selektovaných vzorků byla získána celková DNA, pomocí směsi extrakčního roztoku a roztoku pro tkáňové preparace (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Vzorky byly inkubovány ve vodní lázni o teplotě 55°C 10 minut a 3 minuty při teplotě 95°C. Nakonec byl přidán neutralizační roztok (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a vzorky byly uloženy na led.

4.3. Polymerázová řetězová reakce

Pro zjištění přítomnosti DNA sekvence pro Cre rekombinázu byla provedena polymerázová řetězová reakce (PCR). Z každého vzorku byly odebrány 4 µl DNA do mastermixové směsi pro PCR, která se skládala z Extract-N-Amp enzymu, dvou primerů (5'-GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC-3' a 5'-GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT-3', Jackson Laboratory, Maine, USA) a destilované vody. Tyto PCR vzorky byly vloženy do PCR přístroje (Mastercycler® personal, Eppendorf, NY, USA), který provedl jednotlivé cykly dle nastavení (**tabulka č. 1**). Po ukončení PCR byly jednotlivé vzorky nanесeny na 3% agarózový gel a elektroforeticky odděleny. Nasyntetizované DNA úseky Cre rekombinázy byly obarveny pomocí SyBR safe a vizualizovány pod UV světlem.

Tabulka č. 1: Podmínky polymerázové řetězové reakce (PCR).

Koncentrace	Reakční komponenta	Objem (µl)	Výsledná koncentrace	Celkový objem (µl)	Krok cyklu	Teplota °C	Čas
	ddH ₂ O	2,79	-	2,79	1	94	3 min
10x	PCR Buffer II (ABI)	1,20	1x	1,20	2	94	30 sec
25 mM	MgCl ₂	0,96	2,00 mM	0,96	3	51,7	1 min
2,5 mM	dNTP	0,96	0,20 mM	0,96	4	72	1 min
Opakování kroku 2-4 35 cyklů							
20 µM	oIMR1084	0,60	1,00 µM	0,60	5	72	2 min
20 µM	oIMR1085	0,60	1,00 µM	0,60	6	10	Uchování

4.4. MCAO

Pro indukci ischemického poškození byly použity samci i samice Cre pozitivních myši, které byly 60-90 dní staré. Myši byly uvedeny do spánku pomocí vaporizéru (Tec-3, Cyprane Ltd, Keighley, UK); nejprve s použitím 2,5% Isofluranu, jehož koncentrace byla poté snížena a udržována na 1,8 %. V místě operace byla tkáň dezinfikována iodizolem a anestetizována xylokainem (AstraZeneca). Nejprve byl odstraněn zevní žvýkácí sval (musculus masseter), který začíná na jařmovém oblouku (arcus zygomaticus) a upíná se ke spodní čelisti (mandibula). Dále byl vyvrtán otvor do spánkové kosti a byla odhalena střední mozková artérie, která byla zatavena elektrickým pulzem elektrokoagulátoru (SMT BM M 400, Speciální Medicínská Technologie, s.r.o., Praha, Česká republika). Tento zákrok měl za následek trvalé přerušení krevního zásobení velké oblasti senzomotorické kůry. U myši, které sloužily jako kontrola pro MCAO, byly provedeny všechny kroky operace kromě zatavení mozkové artérie elektrokoagulátorem.

4.5. Transkardiální perfúze myši

Operované myši byly po 4 dnech uspány pentobarbitalem (100 mg/kg i.p., Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Po uvedení do hluboké anestezie jim byla rozstřižena kůže pod hrudním košem, poté následovalo prostřížení bránice a srdeční síně. Injekční stříkačkou bylo do levé srdeční komory postupně aplikováno 20 ml roztoku NMDG: 110 mM NMDG, 2,5 mM KCl, 24,5 mM NaHCO₃, 1,25 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM CaCl₂, 7 mM MgCl₂ a 20 mM glukóza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Konečné pH perfúzního roztoku bylo upraveno pomocí HCl na 7,4 a výsledná osmolarita činila 290 mOsm/kg. Myš byla dekapitována a byl vyjmut mozek, který byl nařezán na vibračním mikrotomu (HM 650 V, Thermo Scientific Microm, Walldorf, Germany) na 350 µm silné řezy. Z tkáňových řezů byl pro buněčné kultury oddělen pouze kortex, který byl inkubován v roztoku papainu (24 U) a cysteinu (6 µg/µl), v 800 µl umělého cerebrospinálního roztoku (aCSF), který obsahoval: 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 28 mM NaHCO₃, 1,25 mM Na₂HPO₄, 10 mM glukózy, 1,5 mM CaCl₂ a 1,3 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), který byl probubláván 95% O₂/5% CO₂ (Carbogen, Linde Gas a.s., Praha, Česká republika).

4.6. Kultivace buněk

Všechny izolované buňky byly odstředěny na centrifuze při 2000 otáčkách 3 minuty. Následně byl odsát supernatant a buňky byly resuspendovány ve 12 ml kultivačního média, jehož hlavní složkou bylo Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium obohacené o směs nutrientů F12 (DMEM/F12, Gibco - Invitrogen Carlsbad, CA, USA) a doplněné o suplement B27 (2%, Gibco - Invitrogen Carlsbad, CA, USA), fetální hovězí sérum (FBS, Baria s.r.o., Psáry – Dolní Jirčany, Česká republika), 4 mM glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a směs antibiotik: Penicilin (10 000 U/ml), Streptomycin (10 000 µg/ml), Amfotericin B (25 µg/ml, Invitrogen Carlsbad, CA, USA). Do média byl přidán PDGFα v koncentraci 20 ng/ml (Peprotech, Rocky Hill, CT, USA). Buňky byly dále pěstovány v kultivačních nádobách jako adherentní kultury v atmosféře z 5% CO₂ při teplotě 37°C v kultivačním médiu. Po namnožení buněk do dostatečného množství, aby mohly být vysety na krycí skla (cca po 3 týdnech), byly tyto buňky uvolněny trypsinem (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a vysety v koncentraci $6 \cdot 10^4$ na krycí skla pokrytá poly-L-lysinem (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Diferenciace buněk probíhala v diferenciačním médiu, jehož základem bylo médium DMEM/F12 (Gibco - Invitrogen Carlsbad, CA, USA) obohacené o suplement B27 (2%, Gibco - Invitrogen Carlsbad, CA, USA) a jednotlivé růstové faktory: bFGF (50 ng/ml), BDNF (30 ng/ml), PDGFα (50 ng/ml), VEGF (10 ng/ml) a morfogen Shh (10 ng/ml, Peprotech, Rocky Hill, CT, USA). Po sedmi dnech diferenciace byla u těchto buněčných kultur provedena imunocytochemická analýza s použitím specifických markerů pro astrocyty, oligodendrocyty, neuroblasty a polydendrocyty.

4.7. Metoda terčíkového zámku

Elektrofyzilogické vlastnosti buněk byly stanoveny s použitím metody terčíkového zámku neboli metodou patch-clamp. Krycí skla s buňkami byla přenesena do perfúzní komůrky měřící aparatury složené z mikroskopu (Axioscop, Zeiss, Gottingen, Germany), digitální kamery s vysokým rozlišením (AxioCam HRc, Zeiss, Germany) a elektronických mikromanipulátorů (Luigs & Neumann, Rattigen, Germany). Perfúzní komůrkou protékal aCSF a jednotlivé buňky na krycích sklech byly měřeny v tzv. konfiguraci celé buňky (z anglického whole-cell configuration; (Hamill et al., 1981) pomocí borosilikátových elektrod (0,86 ID, Sutter Instruments Company, Novato, CA, USA). Elektrody byly vytaženy

na Brown-Flamingově tahači (P-97, Sutter Instruments Company, Novato, CA, USA) a jejich odpor se pohyboval mezi 10-15 M Ω . Byly naplněny intracelulárním roztokem, který obsahoval 10 mM HEPES, 130 mM K-glukonát, 5 mM EGTA, 0,5 mM CaCl₂, 0,3 mM Na-GTP a 3 mM Mg-ATP. Výsledné pH bylo upraveno pomocí KOH na 7,2 a osmolarita byla 270 mmol/kg (Pivonkova et al., 2010). K vizualizaci změřených EGFP pozitivních buněk v jejich následné imunocytochemické identifikaci bylo použito fluorescenční barvivo Alexa Fluor-hydrazid 594 (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). Proudové signály byly zesíleny pomocí zesilovače EPC-10 (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Germany) a data nad 3 kHz byla odfiltrována. Ukládání a vyhodnocení dat bylo zajištěno pomocí programů PATCHMASTER a FITMASTER (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Germany).

4.8. Elektrofyziologická měření, protokoly a analýza

Klidový membránový potenciál (V_m) u měřených buněk byl udržován na -70 mV. V_m byl změřen přepnutím zesilovače EPC-10 do proudového zámku.

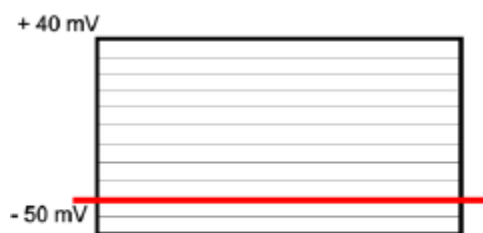
Membránový odpor (R) byl zjištěn aplikací napět'ového pulsu o velikosti 10 mV. Tento puls depolarizoval membránu buněk z udržovacího potenciálu o velikosti -70 mV na -60 mV (trvání pulzu 50 ms) a 40 ms po jeho aplikaci byla odečtena amplituda proudu, ze které byl pomocí Ohmova zákona vypočten vstupní odpor membrány.

Kapacitance membrány (C_m) byla odečtena automaticky ze záznamu v režimu „lock in“ uloženém v programu PATCHMASTER.

Jednotlivé typy proudů byly zjištěny prostřednictvím 3 typů protokolů, které vycházely z výchozího napětí -70, -50 a -110 mV. Proudové odpovědi buňky byly následně měřeny po 10 mV napět'ových krocích od -160 do +40 mV, které trvaly vždy 50 ms. Pro zjištění hodnot napět'ově závislých proudů byla použita metoda odečtení pasivních proudů. **Pasivní proudy** jsou časově i napět'ově nezávislé proudy, jejichž hodnota se odečítá z amplitudy proudu mezi -70 a -60 mV a jejich násobek je odečten od amplitudy konkrétního napět'ového kroku. Hodnoty všech proudů jsou uváděny v pA.

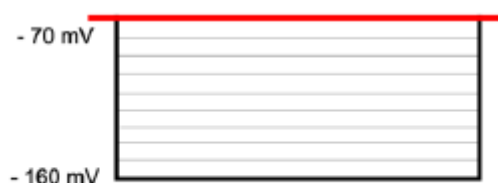
Zpožděné vně usměrněné napět'ově závislé K^+ proudy (K_{DR}) byly získány aplikací napět'ových pulsů vycházejících z napětí -50 mV a pokračujících od -70 mV až do +40 mV,

v 10 mV krocích. Výsledná velikost K_{DR} proudu byla získána z napětového pulsu +40 mV v jeho maximální amplitudě 40 ms po začátku pulsu, po odečtení pasivních proudů.



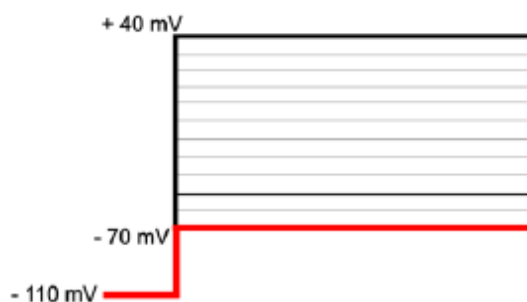
**Protokol pro měření zpožděných vně
usměrněných napětově závislých K^+ proudů
(K_{DR})**

Dovnitř usměrněné napětově závislé K^+ proudy (K_{IR}) byly zjištěny tak, že na membránu buněk byly aplikovány napětové pulsy v rozmezí od -160 do -70 mV. Výsledný proud byl odečten z velikosti jeho maximální amplitudy ve 40 ms po aplikaci pulsu a po odečtení pasivních proudů.

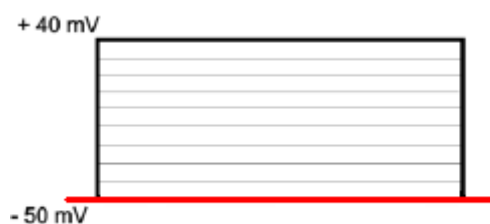


**Protokol pro měření dovnitř
usměrněných napětově závislých K^+
proudů (K_{IR})**

Rychle se aktivující a inaktivující vně usměrněný napětově závislý K^+ proud (K_A) byl získán odečtením napětových proudů vyvolaných při výchozím napětí -50 mV od proudů proměřujících buňku z výchozího napětí -110 mV. Výsledný proud byl odečten z jejich maximální amplitudy.



Mínus



Protokol pro měření rychle se aktivujících a inaktivujících ven usměrněných napětově závislých K^+ proudů (K_A)

Tetrodotoxin (TTX) senzitivní sodný proud (I_{Na}) byl získán odečtením maximální amplitudy proudu změřeného po aplikaci $1 \mu M$ TTX od proudu změřeného před aplikací této látky.

Proudová hustota (CD) byla vypočítána prostřednictvím podílu maximální amplitudy daného proudu C_m . Výsledné hodnoty jsou vyjadřovány v pA/pF. CD_{INa} – proudová hustota TTX-senzitivních Na proudů, CD_{KA} – proudová hustota rychle se aktivujících a inaktivujících vně usměrněných napětově závislých K^+ proudů, CD_{KDR} – proudová hustota zpožděných vně usměrněných napětově závislých K^+ proudů, CD_{KIR} – proudová hustota dovnitř usměrněných napětově závislých K^+ proudů.

Výsledky z buněk naměřených pomocí metody terčíkového zámku byly korelovány s výsledky z imunocytochemické analýzy.

4.9. Imunocytochemická identifikace buněk

Jednotlivá krycí skla pokrytá buňkami byla fixována 12 minut v roztoku 4% paraformaldehydu a následně byla promyta ve fosfátovém pufru složeném z 154,8 mM Na₂HPO₄, 45,2 mM NaH₂PO₄ o pH 7,4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Přidáním blokovacího roztoku: 5% Chemiblocker, 2% kozí sérum, Millipore, Billerica, MA, USA), 1% BSA (Gibco-Invitrogen Carlsbad, CA, USA), 0,5% Triton (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) v PBS byla zajištěna saturace nespecifických proteinových vazeb. Po 2 hodinové inkubaci v tomto roztoku byly přidány primární protilátky (**tabulka č. 2**) a buňky byly inkubovány přes noc ve 4-8°C. Následně byla skla promyta třikrát po deseti minutách PBS a byla přidána sekundární protilátka cílená proti králičí nebo myší primární protilátce. Všechny použité sekundární protilátky byly kozí (ředění 1:200; Alexa 594/660, Molecular Probes). Po 2 hodinové inkubaci v 4-8°C byla provedena další tři desetiminutová omytí PBS a buňky byly inkubovány v roztoku 4, 6-diamidino-2-phenylindolu (DAPI; 300 nM; Invitrogen Carlsbad, CA, USA) pro obarvení jader. Po několika krátkých omytích PBS byla krycí skla montována na podložní skla pomocí média Aqua Poly/Mount (Polysciences, Inc., Washington, PA, USA).

Tabulka č. 2: Primární protilátky použité k imunocytochemické identifikaci jednotlivých proteinových markerů.

Antigen	Typ protilátky	Ředění	Výrobce
DCX	Králičí IgG	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
DCX	Oslí IgG	1:500	Abcam
NG2	Králičí IgG	1:400	Chemicon
PDGFR α	Králičí IgG	1:200	Santa Cruz Biotechnology
GFAP-Cy3	Myší IgG	1:800	Sigma Aldrich
APC	Myší IgG	1:200	Calbiochem

APC – adenomatosis polyposis coli, DCX – doublecortin, GFAP-Cy3 – gliální fibrilární acidický protein konjugovaný s Cy3, NG2 – neurální/gliální antigen 2, PDGFR α – receptor růstového faktoru krevních destiček α .

4.10. Konfokální mikroskopie

Připravená skla byla vložena do komůrky konfokálního mikroskopu Zeiss 510DUO LSM, který je vybaven následujícími lasery, laser DPSS – 561-10 ($\lambda = 560$ nm), diodový laser ($\lambda = 405$ nm), argonový laser ($\lambda = 458, 477, 488, 514$) a helium-neonový laser ($\lambda = 633$ nm). Nasnímané obrázky byly dále zpracovány pomocí softwaru LSM image browser (Zeiss, Gottingen, Germany) a grafického programu Adobe Illustrator CS5,1.

4.11. Statistika

Výsledky byly zpracovány jako aritmetické průměry naměřených hodnot \pm standardní chyba průměru (S.E.M. = standard error mean). Statistická analýza rozdílů mezi jednotlivými skupinami byla provedena pomocí aplikace GraphPad InStat 3 (zkušební verze) za použití jednorozměrného ANOVA testu pro mnohonásobné porovnání s Dunnettovým post-hoc testem, který porovnává naměřené hodnoty s hodnotami v kontrolní skupině. Rozdíly mezi kontrolními buňkami a buňkami, které byly izolovány z operovaných myší, byly zpracovány pomocí dvouvýběrového (nepárového) t-testu. Hodnoty s $p < 0,05$ byly označeny jako signifikantní (*), s $p < 0,01$ jako velmi signifikantní (**) a hodnoty s $p < 0,001$ byly označeny jako extrémně signifikantní (***).

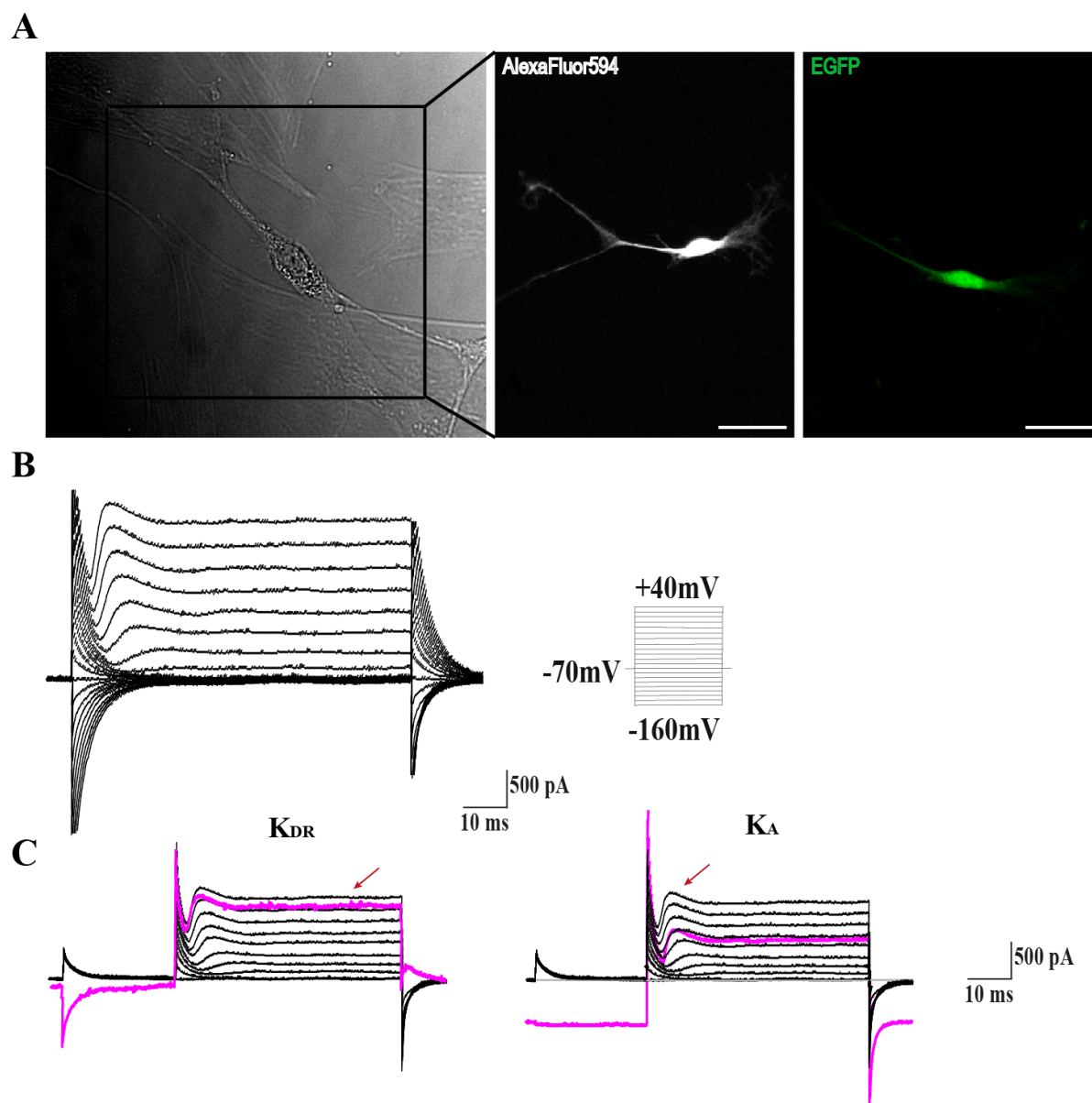
5. Výsledky

5.1. Charakterizace kortikálních EGFP⁺ buněk po sedmi dnech kultivace *in vitro* bez přítomnosti faktorů

Pro zjištění, jak se mění vlastnosti EGFP⁺ buněk izolovaných z myšího kortexu, u nichž je exprese EGFP řízena promotorem pro NG2 proteoglykan, byly tyto buňky nejprve kultivovány bez přítomnosti faktorů (dále jen kontrola). U těchto buněk byla provedena elektrofyziologická charakterizace a imunocytochemická analýza na základní neuronální a gliální markery (NG2, PDGFR α , APC, GFAP, DCX, MAP2) pro určení buněčného typu. Elektrofyziologicky a imunocytochemicky charakterizované buňky byly rozřazeny do dvou základních buněčných typů: typ buněk, který vykazoval proudový profil podobný prekursorovým buňkám (dále jen prekursorový typ) a typ buněk s komplexním proudovým profilem (dále jen komplexní typ).

Prekursorový typ buněk

Pro tento typ buněk byl po morfologické stránce charakteristický oválný tvar těla s jedním až dvěma bipolárními výběžky. V některých případech se tyto výběžky v určité vzdálenosti od těla větvily na dva, až tři další výběžky (**obr. č. 17 A**). Průměrná hodnota V_m byla $-76,24 \pm 3,25$ mV, IR činil $2521,86 \pm 369,74$ M Ω a C_m byla $11,98 \pm 1,00$ pF ($n = 17$). Všechny buňky prekursorového typu vykazovaly CD_{KDR} o průměrné hodnotě $100,96 \pm 8,25$ pA/pF ($n = 17$) a některé z nich také CD_{KA} o průměrné hodnotě $10,23 \pm 2,09$ pA/pF ($n = 10$; **obr. č. 17 B,C**). Žádná z těchto buněk neměla K_{IR} ani I_{Na} . Imunocytochemické barvení základních biologických markerů prokázalo přítomnost NG2 a PDGFR α .

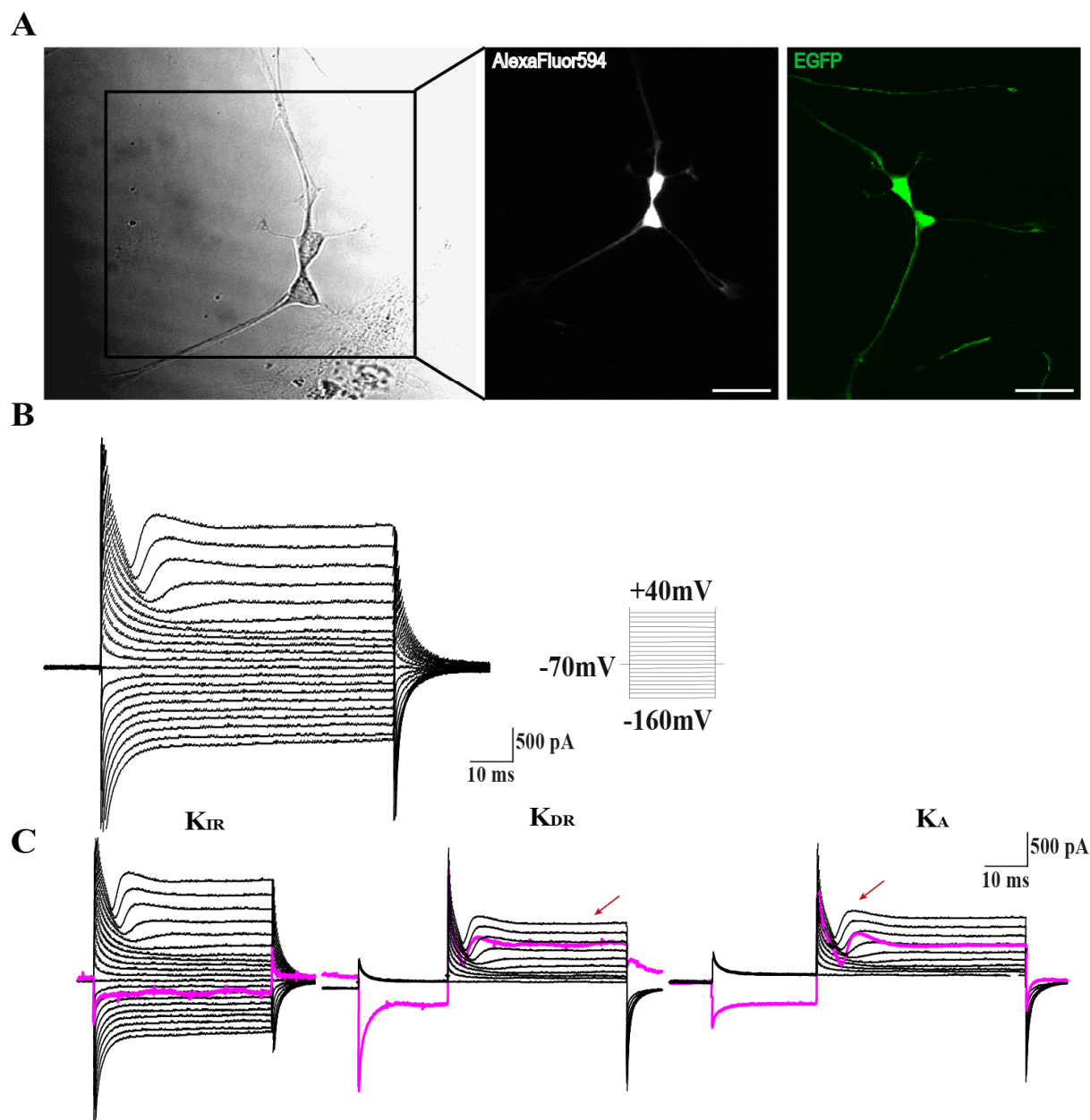


Obrázek č. 17: Charakteristické vlastnosti prekurzorového typu buněk. A) Buňky patřící k prekurzorovému typu měly často bipolární morfologii. Stejná buňka označená pomocí fluorescenčního barviva Alexa Fluor-hydrazid 594 (uprostřed) a zobrazená prostřednictvím konfokálního mikroskopu (vpravo). Měřítka je 50 μm . B) Elektrofyzilogická charakteristika typická pro prekurzorový typ buněk kortexu. C) Proud typické pro prekurzorový typ buněk. Vlevo proud K_{DR} , jehož výsledná amplituda je znázorněna růžově. Vpravo proud K_A , který se vyskytoval pouze u prekurzorového typu buněk.

Komplexní typ buněk

Komplexní typ buněk měl trojúhelníkovitý tvar těla se dvěma až třemi výběžky, které se větily až v určité vzdálenosti od buněčného těla (**obr. č. 18 A**). Tyto buňky měly nepatrně hyperpolarizovaný V_m $-72,36 \pm 3,23$ mV, průměrnou hodnotu IR $1178,86 \pm 353,02$ M Ω a

průměrnou hodnotu C_m $12,17 \pm 1,32$ pF ($n = 11$). Komplexní typ buněk vykazoval K_{DR} , K_A a také K_{IR} (tabulka č. 3, obr. č. 18 B,C). Žádná z komplexních buněk v kontrole nevykazovala TTX-senzitivní I_{Na} . Imunocytochemická analýza u některých z těchto buněk prokázala přítomnost NG2 nebo PDGFR α .



Obrázek č. 18: Vlastnosti komplexního typu buněk. A) Morfologická charakteristika komplexního typu buněk (vlevo-světelný mikroskop), po označení Alexou Fluor-hydrazidem 594 (uprostřed) a zobrazení pomocí konfokálního mikroskopu (vpravo). Měřítka pro obrázek je 50 μ m. B) Typická proudová charakteristika komplexního typu buněk. C) Jednotlivé proudy (K_{IR} , K_{DR} a K_A), označené růžově.

Tabulka č. 3: Membránové vlastnosti EGFP⁺ buněk v kontrole po 7 dnech diferenciaci *in vitro*.

	Komplexní typ buněk			Prekurzorový typ buněk		
	Průměrná hodnota	S.E.M.	n	Průměrná hodnota	S.E.M.	n
V_m (mV)	-72,36	3,23	11	-76,24	3,25	17
IR (MΩ)	1178,86	353,02	11	2521,86	369,74	17
C_m (pF)	12,17	1,32	11	11,98	1,00	17
CD_{KIR} (pA/pF)	3,73	0,58	9	-	-	-
CD_{KDR} (pA/pF)	89,83	9,95	11	100,96	8,25	17
CD_{KA} (pA/pF)	5,82	1,35	11	10,23	2,09	10

C_m – kapacitance membrány, IR – membránový odpor, V_m – klidový membránový potenciál, CD_{KA} - proudová hustota rychle se aktivujících a inaktivujících vně usměrněných napětově závislých K⁺ proudů, CD_{KDR} - proudová hustota zpožděných vně usměrněných napětově závislých K⁺ proudů, CD_{KIR} - proudová hustota dovnitř usměrněných napětově závislých K⁺ proudů, n – počet buněk, S.E.M. - standardní chyba průměru.

5.2. Vliv jednotlivých faktorů na vlastnosti EGFP⁺ buněk v průběhu diferenciaci *in vitro*

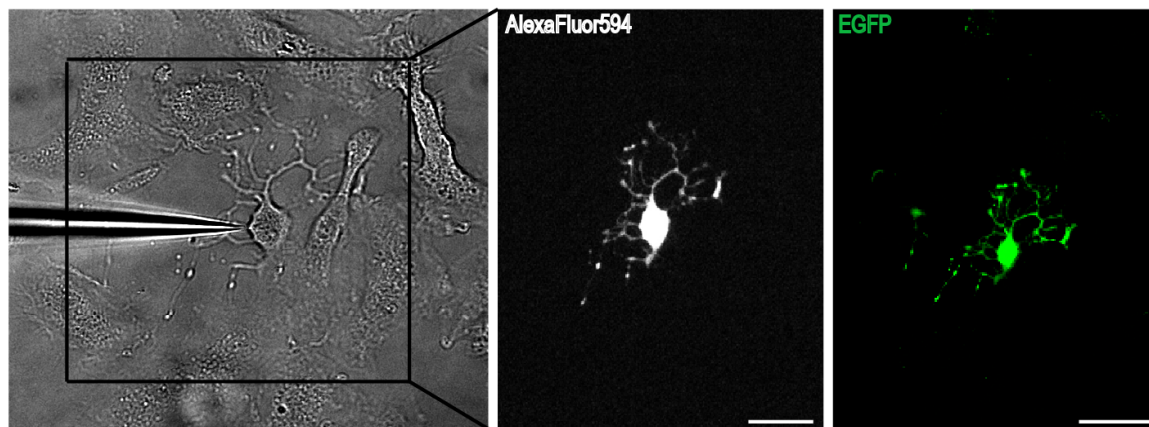
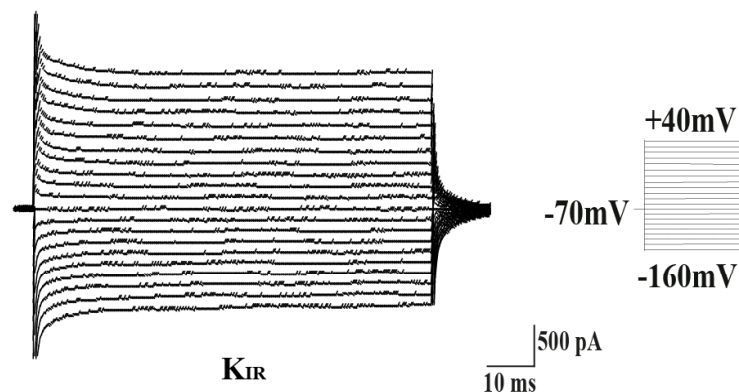
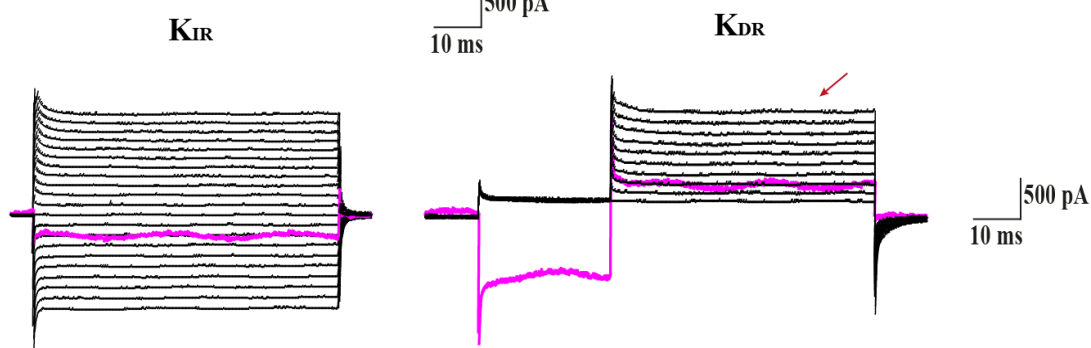
Abychom zjistili, jak jednotlivé faktory (BDNF, bFGF, Shh a VEGF) mění vlastnosti buněk, byly EGFP⁺ buňky vystaveny po tři týdny růstu v kultivačním médiu a následně 7 dní diferenciovány v diferenciačním médiu obsahujícím vždy jeden z faktorů (viz Materiál a metody). Tyto buňky byly následně elektrofyziologicky charakterizovány a u označených a změřených buněk byly sledovány morfologické, elektrofyziologické a imunocytochemické vlastnosti.

5.2.1. Růstové faktory a Shh významně ovlivňují zastoupení jednotlivých buněčných typů

V průběhu analýzy buněk kultivovaných pod vlivem jednotlivých faktorů se u některých z nich, konkrétně u BDNF a VEGF, objevil nový buněčný typ, tzv. pasivní typ buněk.

Pasivní typ buněk

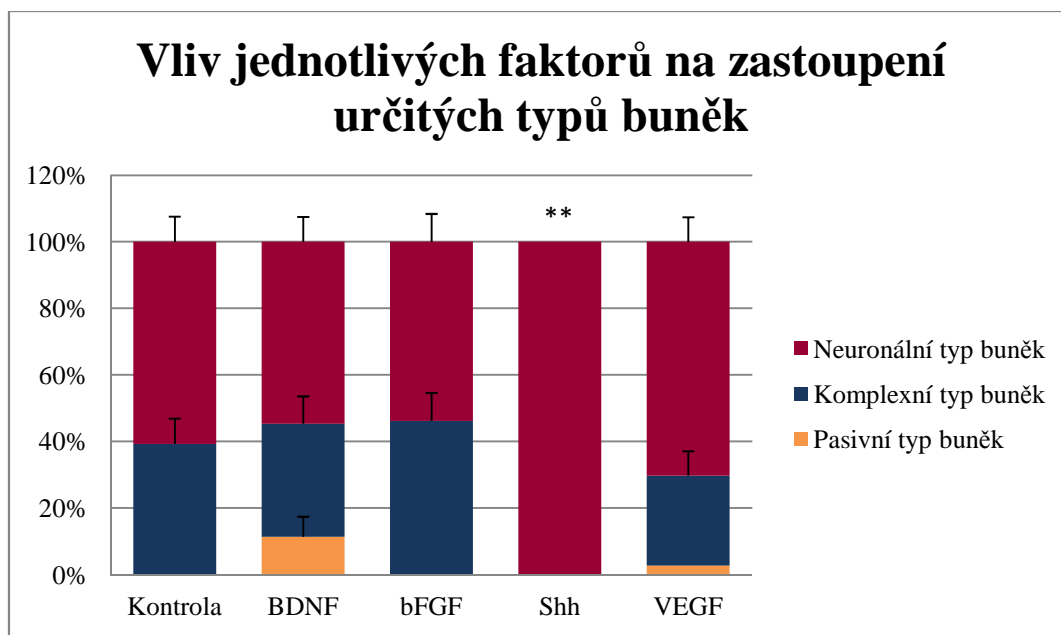
Buňky pasivního typu byly morfologicky identifikovány jako buňky s velkým tělem a mnoha tenkými, hustě rozvětvenými výběžky (**obr. č. 19 A**). Z elektrofyziologického hlediska vykazovaly tyto buňky časově a napětově nezávislé pasivní K⁺ proudy (**obr. č. 19 B**). Vzhledem k tomu, že se tento typ buněk objevil pouze v přítomnosti BDNF a VEGF v kultivačním médiu, přičemž u VEGF se jednalo pouze o jednu buňku, průměrné hodnoty pro jednotlivé pasivní elektrické vlastnosti (V_m , C_m a IR) tohoto typu buněk byly určeny jako průměrné hodnoty pasivního typu buněk vyskytujícího se pod vlivem faktoru BDNF. Pro pasivní typ buněk byla charakteristická hodnota IR $72,44 \pm 8,64 \text{ M}\Omega$, hodnota C_m $103,68 \pm 65,55 \text{ pF}$ a mírně depolarizovaný V_m o velikosti $-50,00 \pm 7,98 \text{ mV}$ ($n = 6$). Imunocytochemické barvení provedené po elektrofyziologickém měření ukázalo pozitivitu na PDGFR α a GFAP.

A**B****C**

Obrázek č. 19: Vlastnosti pasivního typu buněk. **A)** Typická morfologie pasivního typu buněk zobrazená pod světelným mikroskopem (vlevo), po obarvení fluorescenčním barvivem Alexa Fluor-hydrazid 594 (uprostřed) a obrázek z konfokálního mikroskopu zobrazující EGFP (vpravo). Měřítka je 50 μm . **B)** Elektrofyziologická charakteristika pasivního typu buněk. **C)** Jednotlivé proudy (K_{IR} , K_{DR}) jsou znázorněné růžově.

Dále se ukázalo, že jednotlivé faktory mají vliv nejen na výskyt pasivního typu buněk, ale ovlivňují také procentuální zastoupení ostatních dvou typů (prekurzorového a komplexního typu buněk). Jak je vidět z **grafu č. 1**, u faktoru BDNF se objevil pasivní typ buněk. Shh směřoval EGFP⁺ buňky pouze do precursorového typu buněk ($n = 13$), zatímco

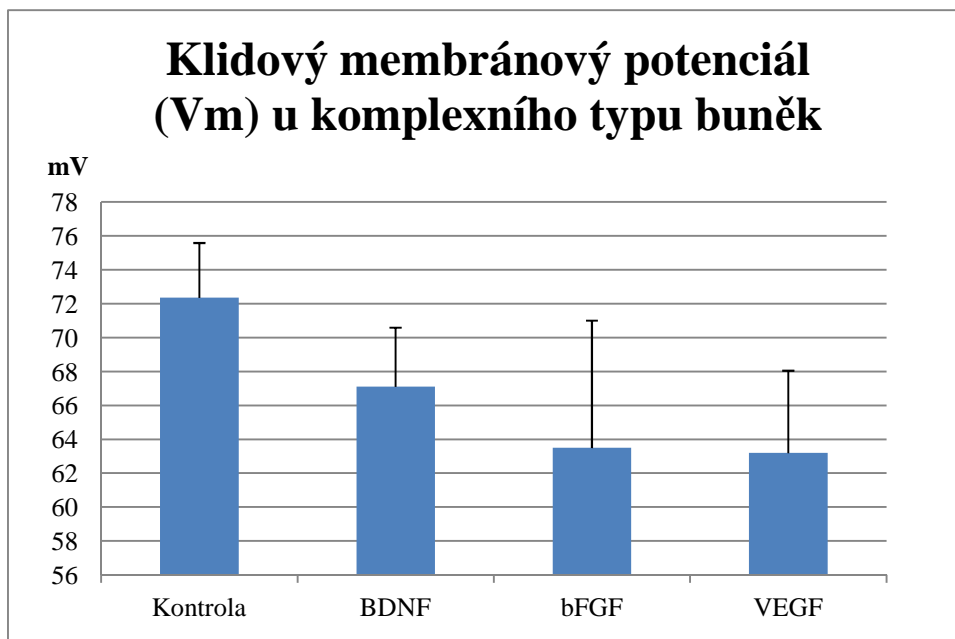
bFGF neměl žádný vliv na zastoupení jednotlivých typů buněk ve srovnání s kontrolními buňkami.



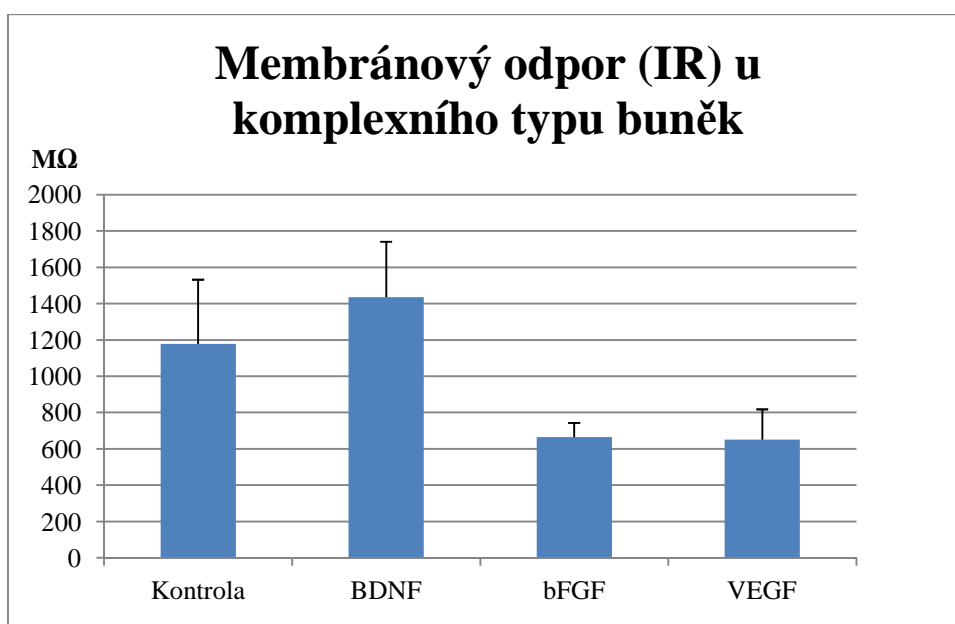
Graf č. 1: Vliv jednotlivých faktorů na zastoupení jednotlivých buněčných typů.

5.2.2. Růstové faktory ovlivňují membránové vlastnosti pouze u prekursorového typu buněk

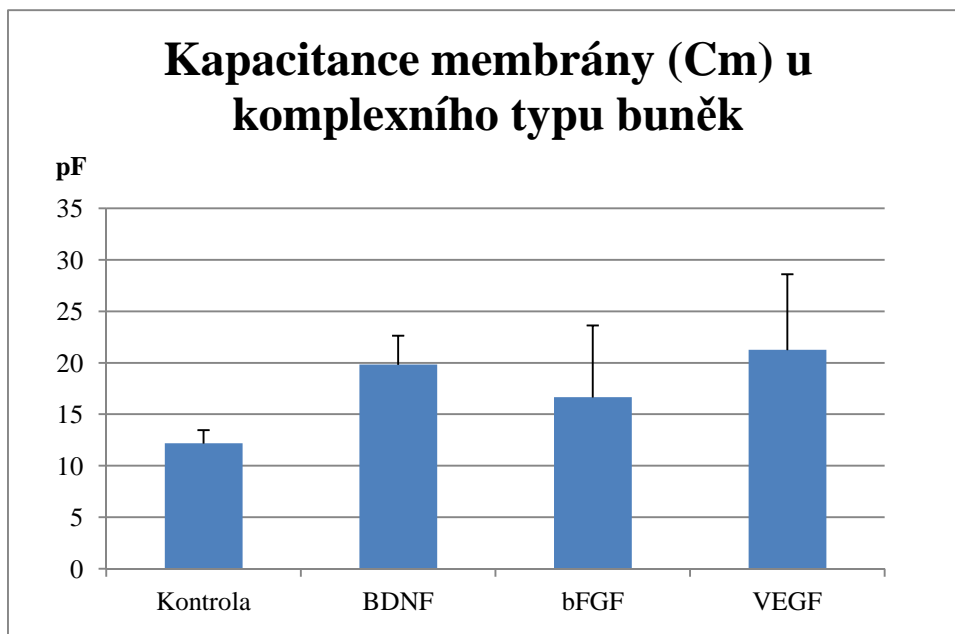
Série měření prověřujících elektrofyziologické vlastnosti jednotlivých typů buněk ukázala, že signifikantní vliv mají jednotlivé faktory pouze na prekursorový typ buněk, na rozdíl od komplexního typu buněk, jejichž elektrofyziologické vlastnosti nebyly ovlivněny (grafy č. 2 - 4).



Graf č. 2: Vliv jednotlivých faktorů na V_m u komplexního typu buněk.

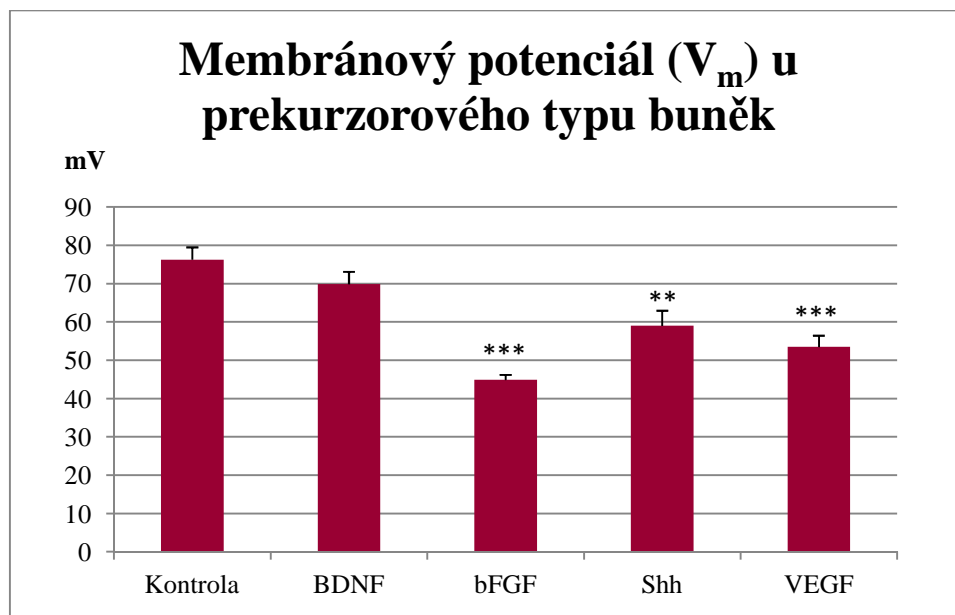


Graf č. 3: Vliv jednotlivých faktorů na IR u komplexního typu buněk.

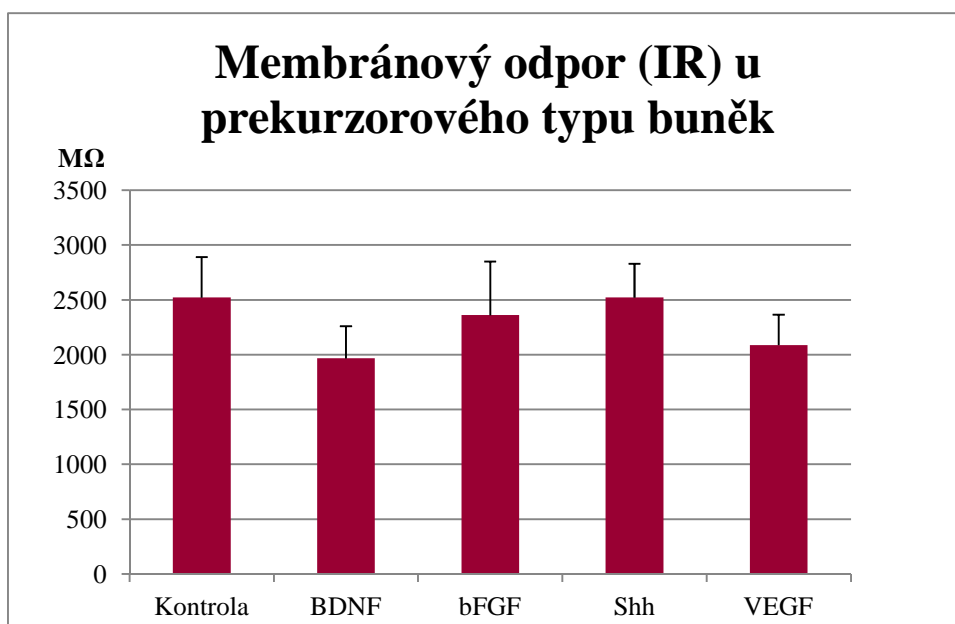


Graf č. 4: Vliv jednotlivých faktorů na C_m u komplexního typu buněk.

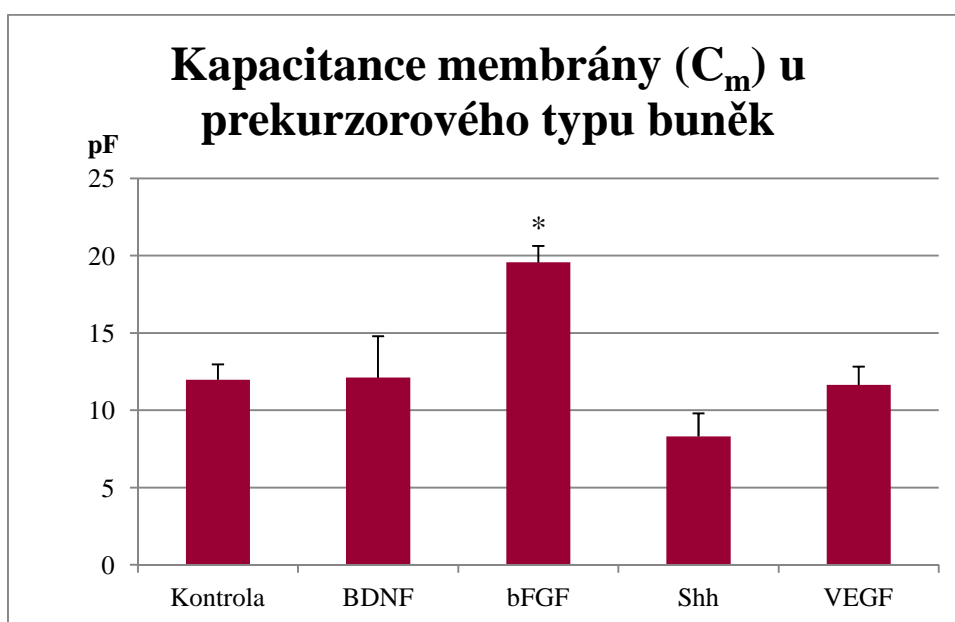
Všechny faktory, s výjimkou BDNF, u prekursorového typu buněk významně depolarizovaly V_m (**graf č. 5**). C_m a IR nebyly signifikantně ovlivněny růstovými faktory (**grafy č. 6, 7**). Pouze byla významně zvýšena C_m u buněk prekursorového typu, které byly kultivovány v přítomnosti bFGF.



Graf č. 5: Vliv jednotlivých faktorů na V_m prekursorového typu buněk. bFGF, VEGF a Shh signifikantně depolarizovaly V_m ve srovnání s kontrolními buňkami. V_m uváděn v absolutních hodnotách.



Graf č. 6: Vliv jednotlivých faktorů na IR prekursorového typu buněk.



Graf č. 7: Vliv jednotlivých faktorů na C_m u prekursorového typu buněk.

5.2.3. BDNF a bFGF ovlivňují proudové charakteristiky prekursorového typu buněk

Pro prekursorový a komplexní typ buněk je charakteristický výskyt K_{DR} a K_A proudů. Ve srovnání s kontrolou jednotlivé faktory neměly vliv na CD_{KA} a CD_{KDR} u komplexního

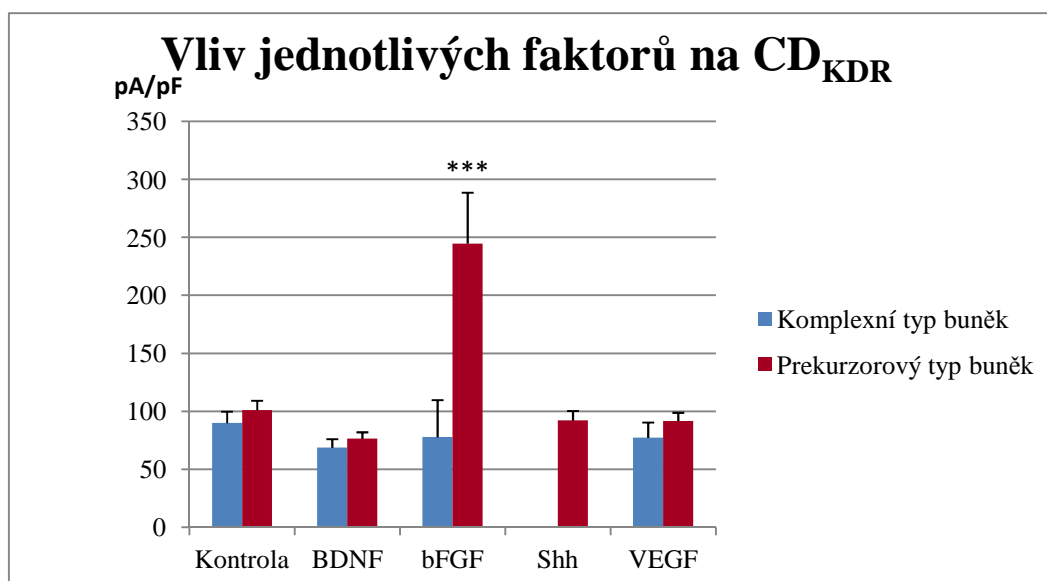
typu buněk. Nicméně, u prekursorového typu buněk bFGF signifikantně ($p < 0,001$, $n = 7$) zvýšil hodnotu CD_{KDR} (tabulka č. 4, graf č. 8), zatímco BDNF signifikantně ($p < 0,05$, $n = 19$) snížil CD_{KA} (tabulka č. 4, graf č. 9). K_A proud se nevyskytoval u všech buněk, ale přibližně u poloviny buněk prekursorového typu.

Tabulka č. 4: Hodnoty membránových vlastností u buněk prekursorového typu.

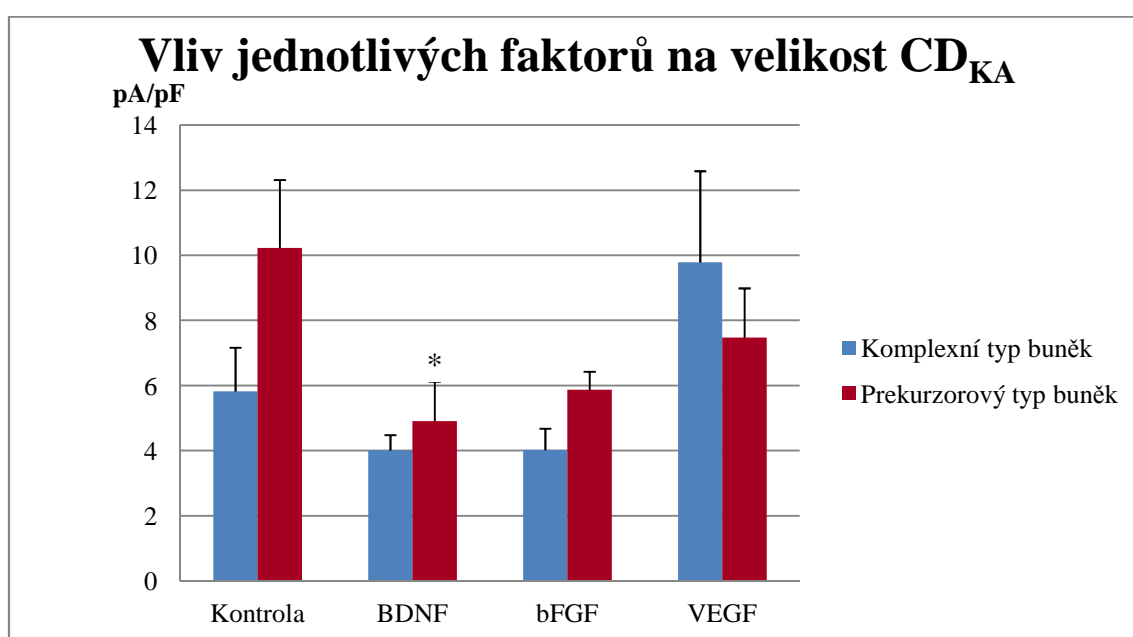
	BDNF			bFGF			Shh		
	Průměr	S.E.M.	n	Průměr	S.E.M.	n	Průměr	S.E.M.	n
V_m (mV)	-69,86	3,23	29	-44,86***	1,35	7	-59,00**	3,95	13
IR (MΩ)	2521,03	293,66	29	1968,09	488,58	7	2088,55	309,54	13
C_m (pF)	19,56	2,68	29	8,31*	1,07	7	11,63	1,49	13
CD_{KDR} (pA/pF)	76,29	5,72	29	244,68***	44,14	7	92,11	8,37	13
CD_{KA} (pA/pF)	4,91*	1,22	19	5,87	0,56	4	-	-	-

	VEGF			Kontrola		
	Průměr	S.E.M.	n	Průměr	S.E.M.	n
V_m (mV)	-53,50***	2,92	26	-76,24	3,25	17
IR (MΩ)	2362,56	279,55	26	2521,86	369,74	17
C_m (pF)	12,11	1,21	26	11,98	1,00	17
CD_{KDR} (pA/pF)	91,63	7,26	26	100,96	8,25	17
CD_{KA} (pA/pF)	7,47	1,52	11	10,23	2,09	10

C_m – kapacitance membrány, IR – membránový odpor, V_m – klidový membránový potenciál, CD_{KA} – proudová hustota rychle se aktivujících a inaktivujících vně usměrněných napěťově závislých K^+ proudů, CD_{KDR} – proudová hustota zpožděných vně usměrněných napěťově závislých K^+ proudů, n – počet buněk, S.E.M. - standardní chyba průměru.



Graf č. 8: Vliv jednotlivých faktorů na velikost CD_{KDR} . Jediným faktorem, který v porovnání s kontrolou signifikantně zvyšoval velikost CD_{KDR} byl faktor bFGF, a to pouze u prekurzorového typu buněk.



Graf č. 9: Vliv jednotlivých faktorů na velikost CD_{KA} . Velikost CD_{KA} byla signifikantně snížena při působení faktoru BDNF, a to pouze u prekurzorového typu buněk.

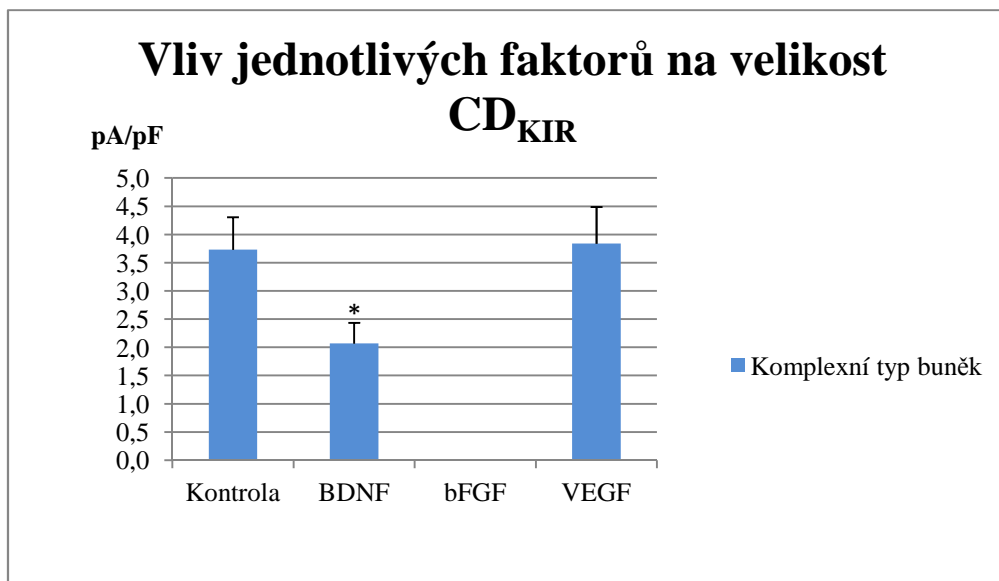
5.2.4. BDNF ovlivňuje amplitudu K_{IR} proudů a výskyt I_{Na} proudů u komplexního typu buněk

Komplexní typ buněk vykazuje oproti prekurzorovému typu navíc dovnitř usměrňující proudy K_{IR} , a právě velikost tohoto typu proudu byla signifikantně snížena vlivem faktoru BDNF (**tabulka č. 5, graf č. 10**). Navíc byl tento typ proudu zcela potlačen u faktoru bFGF. Kromě toho, BDNF stimuloval výskyt dovnitř usměrněného proudu I_{Na} , který se vyskytoval ve třech případech komplexního typu buněk a nikdy se nevyskytoval v kontrolních buňkách komplexního typu. Tento typ proudu se vyskytl také u jedné z komplexních buněk, které byly kultivovány v přítomnosti faktoru bFGF. V přítomnosti BDNF průměrná hodnota CD_{INa} byla $11,71 \pm 3,35$ pA/pF ($n = 3$) a případě bFGF 3,5 pA/pF ($n=1$).

Tabulka č. 5: Membránové vlastnosti komplexního typu buněk.

	bFGF			BDNF			VEGF			Kontrola		
	Průměr	S.E.M.	n	Průměr	S.E.M.	n	Průměr	S.E.M.	n	Průměr	S.E.M.	n
V_m (mV)	-63,50	7,51	6	-67,11	3,48	18	-63,20	4,86	10	-72,36	3,23	11
IR (MΩ)	665,46	78,07-	6	1435,94	304,89	18	651,52	166,40	10	1178,86	353,02	11
C_m (pF)	16,67	3,95-	6	19,83	2,83	18	21,27	6,99	10	12,17	1,32	11
CD_{KIR} (pA/pF)	-	-		2,07*	0,37	10	3,84	0,65	5	3,73	0,58	9
CD_{KDR} (pA/pF)	77,80	32,09	6	68,70	7,35	18	77,33	13,21	10	89,83	9,95	11
CD_{KA} (pA/pF)	4,02	0,66	6	4,01	0,47	18	9,78	2,81	10	5,82	1,35	11
CD_{INa} (pA/pF)	-	-	-	11,71	3,35	3	-	-	-	-	-	-

C_m – kapacitance membrány, IR – membránový odpor, V_m – klidový membránový potenciál, CD_{INa} - proudová hustota TTX-senzitivního Na proudu, CD_{KA} - proudová hustota rychle se aktivujících a inaktivujících vně usměrněných napětově závislých K^+ proudů, CD_{KDR} - proudová hustota zpožděných vně usměrněných napětově závislých K^+ proudů, CD_{KIR} - proudová hustota dovnitř usměrněných napětově závislých K^+ proudů, n – počet buněk, S.E.M. - standardní chyba průměru.



Graf č. 10: Vliv jednotlivých faktorů na přítomnost a velikost dovnitř CD_{KIR} .

5.2.5. BDNF ovlivňuje výskyt pasivního typu buněk

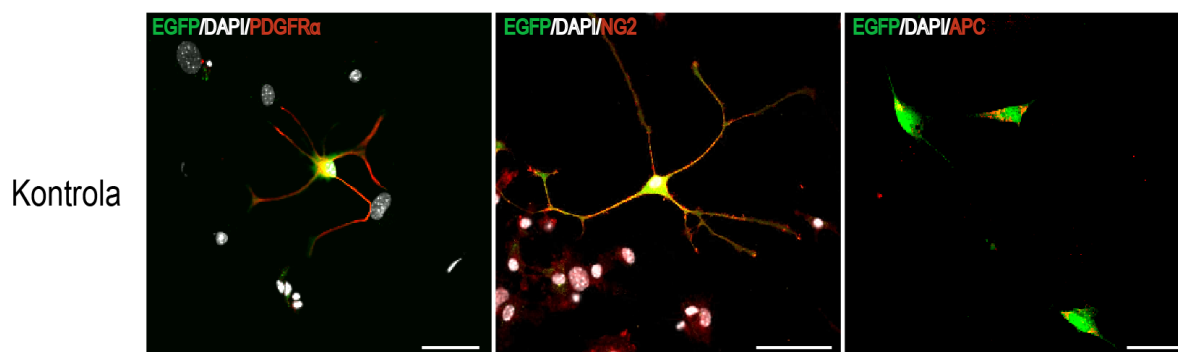
Ačkoli se pasivní typ buněk nevyskytoval v kontrole, kultivace v přítomnosti BDNF stimulovala výskyt tohoto buněčného typu, pro který je charakteristická především exprese napětově/časově nezávislých K^+ proudů. Nicméně, tyto buňky vykazovaly i napětově závislé, K_{IR} a K_{DR} proudy ($CD_{KIR} = 2,30 \pm 1,25$ pA/pF, $n = 2$; $CD_{KDR} = 1,83 \pm 0,69$ pA/pF, $n = 4$). V jednom případě se pasivní typ buněk objevil také u buněk kultivovaných v přítomnosti faktoru VEGF.

5.2.6. Výskyt oligodendrocytů

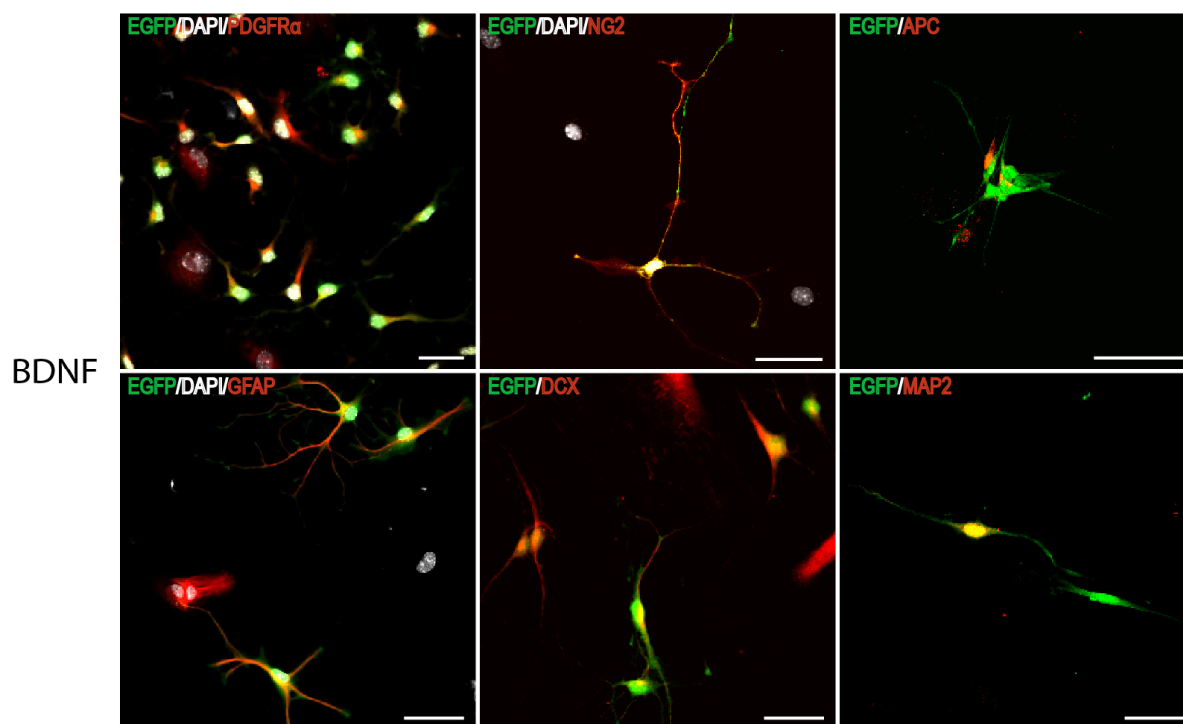
Ačkoli jsou polydendrocyty považovány za prekurzory oligodendrocytů (Zhu et al., 2008), v kontrole se tento buněčný typ nevyskytoval. Pouze pod vlivem faktorů BDNF (ve dvou případech) a VEGF (v jednom případě) se objevily oligodendrocyty vzniklé z $EGFP^+$ buněk.

5.3. Imunocytochemická analýza buněk kultivovaných pod vlivem jednotlivých faktorů a morfogenů

Imunocytochemická analýza buněk, které byly diferenciovány bez přítomnosti faktorů, ukázala, že EGFP⁺ buňky exprimovaly na svém povrchu především markery polydendrocytů PDGFR α , NG2 a v některých případech také marker oligodendrocytů APC (obr. č. 20), ani jedna buňka v kontrole neexprimovala marker astrocytů (GFAP), neuroblastů (DCX) nebo zralých neuronů (MAP2). Při kultivaci EGFP⁺ buněk pod vlivem jednotlivých faktorů nedocházelo ke změnám v expresi jednotlivých markerů s výjimkou faktoru BDNF, u kterého jsme detekovali buňky, které exprimovaly GFAP a DCX. Na druhou stranu, ani u tohoto faktoru nedocházelo k expresi MAP2 (obr. č. 21).



Obrázek č. 20: Imunocytochemická analýza buněk kultivovaných bez faktorů. Na obrázcích jsou zobrazeny sledované markery pro určení konkrétního buněčného typu. PDGFR α a NG2 - markery polydendrocytů, APC - marker oligodendrocytů, DAPI – marker značící buněčná jádra. Měřítka je 50 μ m.

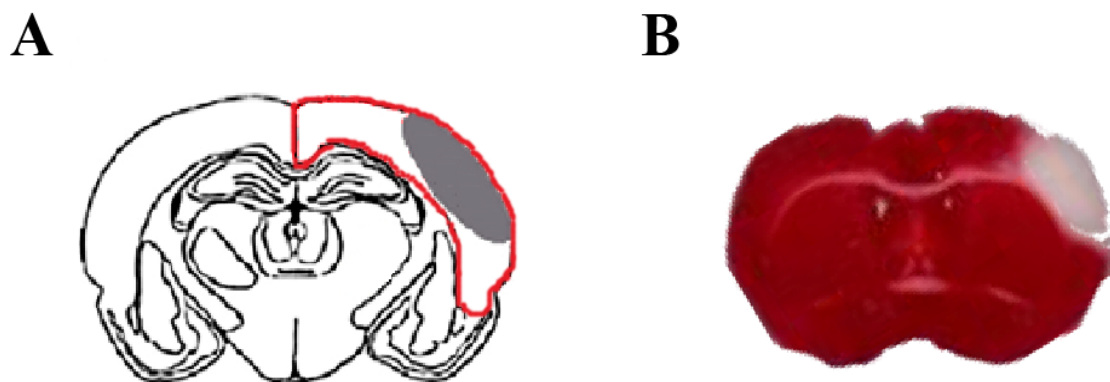


Obrázek č. 21: Imunocytochemická analýza buněk pod vlivem BDNF. Na obrázcích jsou zobrazeny sledované markery pro určení konkrétního buněčného typu. DCX a GFAP se vyskytovaly pouze u EGFP⁺ buněk, které byly kultivovány pod vlivem tohoto faktoru. PDGFR α a NG2 - markery polydendrocytů, APC – marker oligodendrocytů, GFAP – marker astrocytů, DCX - marker neuroblastů, MAP2 – marker zralých neuronů, DAPI – marker značící buněčná jádra. Měřítka je 50 μ m.

5.4. Vliv MCAO na zastoupení jednotlivých typů buněk a jejich elektrofyziologické a imunocytochemické vlastnosti

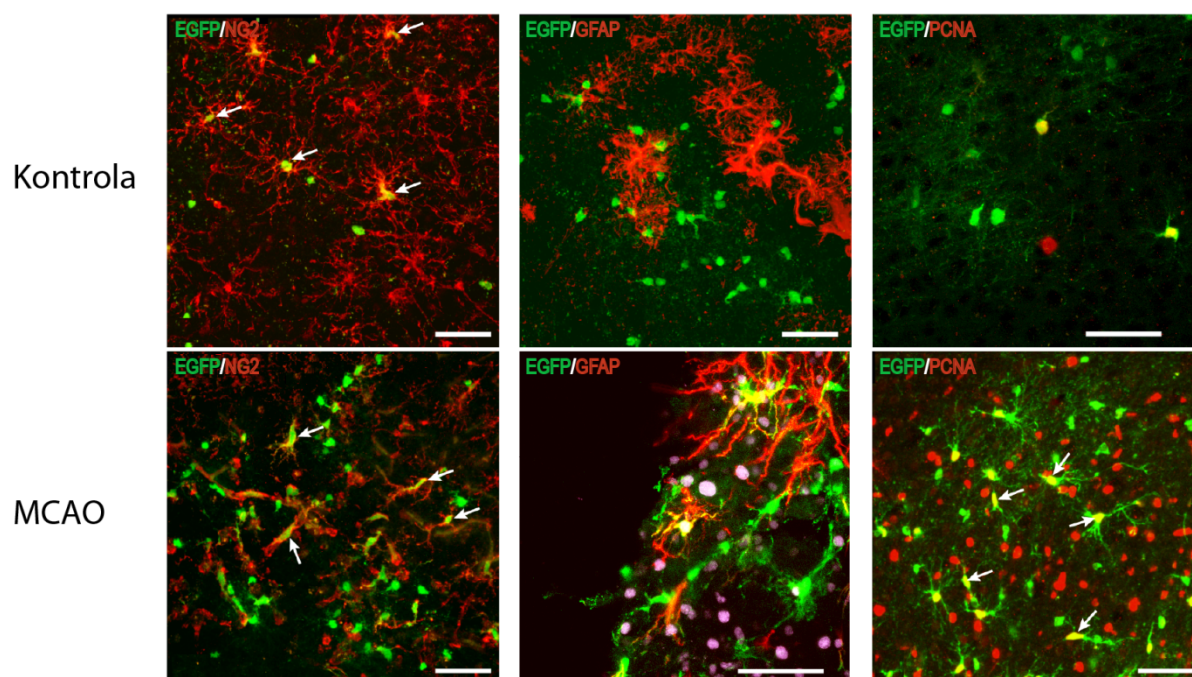
5.4.1. Ischemické poškození mozku vyvolané MCAO

Ischemické poškození mozku, které vzniklo čtyři dny po provedení MCAO bylo rozlišeno pomocí trifenyl tetrazolium chloridu (TTC), který funguje jako redoxní indikátor a barví živou tkáň červeně, na rozdíl od mrtvé tkáně, která zůstává bílá. Jak je vidět z **obr. č. 22 B**, MCAO indukuje lézi, která je lokalizována především v mozkové kůře.



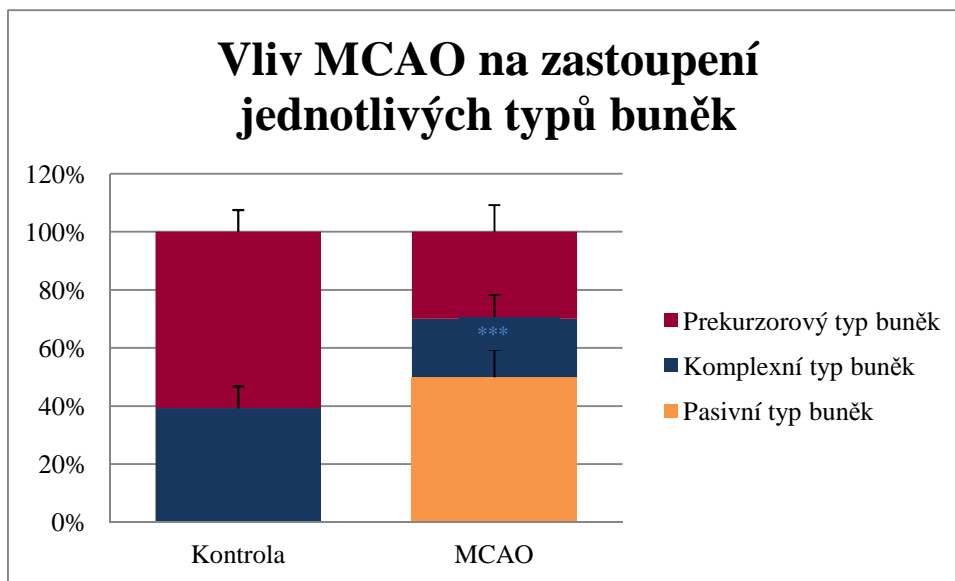
Obrázek č. 22: Infarktová oblast vzniklá po MCAO. A) Schématický obrázek koronárního řezu mozku, na kterém je zobrazená infarktová oblast vzniklá po provedení MCAO. Červeně zvýrazněná oblast kortexu, která byla izolována pro kultivaci EGFP⁺ buněk. B) Koronární řez mozku, který zobrazuje infarktovou oblast (bíle), která je zviditelněna pomocí barvení TTC (schéma obrázku z (He et al., 2007).

Pro imunocytochemickou analýzu změn vyvolaných ischemickým poškozením po MCAO, byly použity proteinové markery pro detekci proliferace, konkrétně jaderný antigen proliferujících buněk (PCNA). Dále byly použity markery pro identifikaci konkrétních buněčných typů vzniklých z EGFP⁺ buněk. Jak je znázorněno na **obr. č. 23**, EGFP⁺ buňky po ischemii (MCAO) významně proliferují (viz kolokalizace EGFP a PCNA) a zvyšují expresi NG2 a GFAP.



Obrázek č. 23: Vliv ischemického poškození na diferenciační potenciál $EGFP^+$ polydendrocytů. Koronální řezy mozkové kůry, které demonstrují NG2, GFAP a PCNA pozitivní barvení u polydendrocytů v nepoškozené kůře (kontrola) a v ischemicky poškozené kůře, 4 dny po MCAO. Polydendrocyty po MCAO výrazně proliferují (PCNA – marker proliferujících buněk) a exprimují *de novo* GFAP, marker astrocytů. Také se zvyšuje celkový počet $EGFP^+/NG2^+$ buněk. Koexprese EGFP a GFAP nebyla v kontrole detekována. Žlutá barva a bílé šipky ukazují buňky, u kterých dochází ke kolokalizaci EGFP a daného markeru zobrazeného červeně.

Abychom objasnili, jaké buněčné typy vznikají z $EGFP^+$ buněk po MCAO, izolovali jsme tyto buňky z kortexu ischemické hemisféry (**obr. 22A**), kultivovali je v přítomnosti PDGF α a po 7 dnech byla provedena elektrofyzilogická a imunocytochemická analýza. Tyto analýzy odhalily, že po MCAO dochází v $EGFP^+$ populaci buněk k výskytu tří typů buněk: prekursorového, komplexního i pasivního typu buněk. Jak je znázorněno v **grafu č. 11**, MCAO indukovala vznik pasivního typu buněk, které tvořily až 50 % z celkového počtu $EGFP^+$ buněk.



Graf č. 11: Vliv MCAO na zastoupení jednotlivých typů buněk. Po MCAO docházelo ke zvýšenému výskytu pasivního typu buněk, a to u více než poloviny naměřených buněk.

MCAO neměla vliv na membránové vlastnosti komplexního typu buněk, pouze u prekurzorového typu snížila IR ve srovnání s kontrolou (**tabulka č. 6**).

Tabulka č. 6: Membránové vlastnosti prekurzorového a komplexního typu buněk po MCAO.

Prekurzorový typ buněk						
	Kontrola			MCAO		
	Průměr	S.E.M.	n	Průměr	S.E.M.	n
V_m (mV)	-70,08	4,88	13	-66,67	9,51	6
IR (MΩ)	2207,22	444,14	13	1458,41**	359,46	6
C_m (pF)	14,72	1,27	13	7,52	2,30	6
CD_{KDR} (pA/pF)	106,16	7,63	13	143,60	36,76	6
CD_{KA} (pA/pF)	3,53	0,66	9	8,18	3,98	4

Komplexní typ buněk						
	Kontrola			MCAO		
	Průměr	S.E.M.	n	Průměr	S.E.M.	n
V_m (mV)	-74,57	6,29	7	-72,25	3,90	4
IR (MΩ)	817,03	195,86	7	1010,04	707,39	4
C_m (pF)	15,19	1,08	7	13,63	3,25	4
CD_{KIR} (pA/pF)	5,22	1,09	2	4,83	0,67	3
CD_{KDR} (pA/pF)	96,96	11,27	7	80,94	31,10	4
CD_{KA} (pA/pF)	6,32	1,06	7	3,75	1,71	4

C_m – kapacitance membrány, IR – membránový odpor, V_m – klidový membránový potenciál, CD_{KA} – proudová hustota rychle se aktivujících a inaktivujících vně usměrněných napětově závislých K^+ proudů, CD_{KDR} – proudová hustota zpožděných vně usměrněných napětově závislých K^+ proudů, CD_{KIR} – proudová hustota dovnitř usměrněných napětově závislých K^+ proudů, n – počet buněk, S.E.M. – standardní chyba průměru.

6. Diskuze

6.1. BDNF a Shh významně ovlivňují zastoupení jednotlivých buněčných typů

Naše výsledky ukázaly, že faktory BDNF a VEGF podporují vznik pasivního typu buněk, který by mohl na základě elektrofyziologických vlastností odpovídat buď astrocytům (Bordey a Sontheimer, 2000) nebo neurálním kmenovým buňkám (Liu et al., 1999). Pro přesnou identifikaci těchto buněk je nutné doplnit imunocytochemickou analýzu zaměřenou na expresi glutamin syntázy, která je specificky exprimována u astrocytů (Norenberg a Martinez-Hernandez, 1979) a mozkového proteinu, který váže lipidy (BLBP) a který je exprimován u radiálních glií (Feng et al., 1994). Na druhou stranu, morfogen Shh podporoval tvorbu prekursorového typu buněk, který byl zároveň nejvýrazněji ovlivněn jednotlivými faktory. Po elektrofyziologické stránce faktory bFGF, VEGF a morfogen Shh depolarizovaly V_m prekursorového typu buněk. Navíc bFGF zvyšoval C_m a CD_{KDR} , z čehož vyplývá, že bFGF zřejmě podporuje diferenciaci prekursorového typu buněk do neuroblastů, protože po morfologické a elektrofyziologické stránce se prekursorový typ buněk velmi podobá nezralým neuronům embryonálního kortexu, pro něž je typická bipolární morfologie, depolarizovaný V_m (~45 mV) a vysoká hodnota IR (~1,5 G Ω ; Walker et al., 2007). Liu a spoluautoři navíc ukázali, že neurální kmenové buňky vykazují především K_{DR} proudy a velmi malé, nebo žádné K_A proudy (Liu et al., 2006), což odpovídá i našim výsledkům. Dalším faktorem, který ovlivňoval elektrofyziologické vlastnosti prekursorového typu buněk, byl Shh, který zcela inhiboval K_A proudy, takže zůstaly zachovány pouze K_{DR} proudy, což poukazuje na vliv Shh na udržení progenitorového stavu buněk, jak bylo popsáno u neonatálních kmenových/progenitorových buněk SVZ (Prajerova et al., 2010a). U komplexního typu buněk, který po elektrofyziologické stránce vykazoval charakteristiky zralých polydendrocytů (přítomnost K_{IR} , K_{DR} , K_A a vzácně také I_{Na} proudů; Schools et al., 2006), nebyl zaznamenán žádný vliv jednotlivých faktorů na elektrofyziologické vlastnosti EGFP⁺ polydendrocytů, s výjimkou BDNF, který snižoval CD_{KIR} , a bFGF, který výskyt K_{IR} proudů zcela potlačil. Některé studie ukazují, že potlačení exprese K_{IR} proudů vede k depolarizaci V_m , což v konečném důsledku zvyšuje proliferaci buněk (Yasuda et al., 2008). Z tohoto důvodu se domníváme, že by faktory BDNF a bFGF mohly stimulovat buňky k proliferaci, jak již bylo ukázáno po ischemii u faktoru bFGF (Jin-qiao et al., 2009) a *in vitro*

u neurálních kmenových buněk v nepoškozeném mozku u faktoru BDNF (Zhang et al., 2011). Na druhou stranu, imunocytochemická analýza ukázala expresi DCX (markeru neuroblastů; **obr. č. 21**) u EGFP⁺ buněk, které po morfologické stránce (bipolární morfologie) velmi připomínaly prekursorový typ buněk, což by odpovídalo studii, která ukázala, že BDNF zvyšuje tvorbu migrujících neuroblastů v SVZ (Petridis a El Maarouf, 2011). Pro přesné vyšetření vlivu BDNF a bFGF na proliferaci polydendrocytů by bylo vhodné doplnit tyto výsledky o imunocytochemickou kvantifikaci založenou na přítomnosti markerů proliferujících buněk (např. PCNA) a markerů určujících konkrétní buněčný typ.

6.2. MCAO indukuje proliferaci EGFP⁺ buněk a jejich zrání do astrocytů

Po MCAO došlo k vytvoření korové léze, která indukovala proliferaci buněk, jak bylo potvrzeno kolokalizací EGFP a PCNA imunocytochemickou analýzou. Ischemická léze neměla vliv na elektrofyziologické vlastnosti EGFP⁺ buněk, s výjimkou prekursorového typu buněk, u kterého signifikantně snižovala C_m. Naše výsledky získané v průběhu kultivace ukázaly, že ischemické poškození zvyšuje proliferaci EGFP⁺ polydendrocytů a jejich následné dozrávání v GFAP⁺ astrocyty, jak je patrné z imunocytochemické analýzy *in vitro* na **obr. č. 23**, kde 4 dny po MCAO byla detekována současná exprese EGFP a GFAP u velkého počtu buněk. U buněčné kultury, která byla izolována z nepoškozené mozkové kůry, jsme současnou expresi EGFP a GFAP nedetkovali. Vznik astrocytů z EGFP⁺ polydendrocytů byl také potvrzen elektrofyziologickou analýzou, která ukázala, že z buněk izolovaných z oblasti ischemické léze vzniká až 50% buněk pasivního typu, které jsou GFAP⁺. Po ischemickém poškození, dochází po určité době k tvorbě gliální jizvy, která je tvořena především GFAP⁺ reaktivními astrocyty (Pekny a Nilsson, 2005), jejichž původ není přesně znám (Goritz et al., 2011). Astrocyty obecně vykazují poměrně nízkou proliferativní aktivitu, jak již bylo popsáno u ischemického poškození CA1 oblasti hipokampu, kdy pouze 8% astrocytů proliferovalo. Nicméně, v průběhu ischemie/reperfúze se jejich počet zvýšil z původních ~10% z celkového počtu buněk na 30 % (Anderova et al., 2011). I přesto, že některé studie ukazují, že astrocyty vznikají z polydendrocytů pouze v embryonálním mozku (Zhu et al., 2011b), naše výsledky dokazují, že po MCAO dochází k indukci diferenciaci EGFP⁺ polydendrocytů právě do astrocytů i v dospělém mozku, což je v souladu se studií, která poukazuje na tvorbu astrocytů z polydendrocytů také v dospělosti (Alonso, 2005). Z tohoto důvodu vyvstává otázka, jaké mechanismy se účastní aktivace polydendrocytů a jejich diferenciaci do astrocytů po

ischemickém poškození mozku. Jak jsme ukázali, právě konkrétní faktory jako BDNF by mohly indukovat diferenciaci polydendrocytů do astrocytů. Proto by logickým pokračováním této studie mělo být studium vlivu jednotlivých faktorů na buňky izolované z ischemicky poškozené oblasti mozku, a zvláštní pozornost by měla být věnována i možným vzájemným interakcím mezi těmito faktory.

7. Závěr

V této práci jsme ukázali, že z EGFP⁺ polydendrocytů izolovaných z kmene myší B6;FVB – Tg (Cspg4-cre)1Akik/J vznikají tři buněčné typy: pasivní, komplexní a prekursorový typ buněk. Analýza diferenciačního potenciálu EGFP⁺ polydendrocytů v přítomnosti faktorů a morfogenů (BDNF, bFGF, Shh a VEGF) v *in vitro* podmínkách ukázala, že:

- Shh podporuje výhradně vznik prekursorového typu buněk, zatímco komplexní typ buněk zcela potlačuje.
- BDNF významně zvyšuje incidenci pasivního typu buněk.
- Faktory bFGF, Shh a VEGF depolarizují klidový membránový potenciál u prekursorového typu buněk.
- Faktor bFGF zvyšuje kapacitanci membrány a proudovou hustotu K_{DR} proudů u prekursorového typu buněk, zatímco BDNF snižuje proudovou hustotu K_{IR} proudů u komplexního typu buněk.
- Jednotlivé faktory nemají vliv na změny v expresi základních gliálních a neuronálních markerů s výjimkou BDNF, u kterého imunocytochemická analýza ukázala zvýšenou expresi markeru astrocytů – GFAP a markeru neuroblastů – DCX.
- MCAO zvyšovala významně proliferaci EGFP⁺ polydendrocytů a jejich diferenciaci do astrocytů

8. Seznam použité literatury

- Adermark L, Lovinger DM (2008) Electrophysiological properties and gap junction coupling of striatal astrocytes. *Neurochem Int* 52:1365-1372.
- Aguirre AA, Chittajallu R, Belachew S, Gallo V (2004) NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus. *J Cell Biol* 165:575-589.
- Alonso G (2005) NG2 proteoglycan-expressing cells of the adult rat brain: possible involvement in the formation of glial scar astrocytes following stab wound. *Glia* 49:318-338.
- Amankulor NM, Hambardzumyan D, Pyonteck SM, Becher OJ, Joyce JA, Holland EC (2009) Sonic hedgehog pathway activation is induced by acute brain injury and regulated by injury-related inflammation. *J Neurosci* 29:10299-10308.
- Anderova M, Vorisek I, Pivonkova H, Benesova J, Vargova L, Cicanic M, Chvatal A, Sykova E (2011) Cell death/proliferation and alterations in glial morphology contribute to changes in diffusivity in the rat hippocampus after hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:894-907.
- Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N (2004) Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 41:881-890.
- Ara J, Fekete S, Zhu A, Frank M (2010) Characterization of neural stem/progenitor cells expressing VEGF and its receptors in the subventricular zone of newborn piglet brain. *Neurochemical research* 35:1455-1470.
- Bakiri Y, Karadottir R, Cossell L, Attwell D (2011) Morphological and electrical properties of oligodendrocytes in the white matter of the corpus callosum and cerebellum. *The Journal of physiology* 589:559-573.
- Banerjee SB, Rajendran R, Dias BG, Ladiwala U, Tole S, Vaidya VA (2005) Recruitment of the Sonic hedgehog signalling cascade in electroconvulsive seizure-mediated regulation of adult rat hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 22:1570-1580.
- Belachew S, Chittajallu R, Aguirre AA, Yuan X, Kirby M, Anderson S, Gallo V (2003) Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *J Cell Biol* 161:169-186.
- Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE (2000) Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 405:187-191.
- Bordey A, Sontheimer H (2000) Ion channel expression by astrocytes in situ: comparison of different CNS regions. *Glia* 30:27-38.
- Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, Tanabe J, Pulsinelli W (1988) Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:474-485.
- Brunne B, Zhao S, Derouiche A, Herz J, May P, Frotscher M, Bock HH (2010) Origin, maturation, and astroglial transformation of secondary radial glial cells in the developing dentate gyrus. *Glia* 58:1553-1569.
- Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, Gotz M (2008) Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3581-3586.
- Butt AM, Duncan A, Hornby MF, Kirvell SL, Hunter A, Levine JM, Berry M (1999) Cells expressing the NG2 antigen contact nodes of Ranvier in adult CNS white matter. *Glia* 26:84-91.
- Bye N, Carron S, Han X, Agyapomaa D, Ng SY, Yan E, Rosenfeld JV, Morganti-Kossmann MC (2011) Neurogenesis and glial proliferation are stimulated following diffuse traumatic brain injury in adult rats. *J Neurosci Res* 89:986-1000.
- Coyle P, Feng X (1993) Risk area and infarct area relations in the hypertensive stroke-prone rat. *Stroke* 24:705-709; discussion 710.
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelsø C, Holtas S, van Roon-Mom WM, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Frisen J, Dragunow M, Faull RL, Eriksson PS (2007)

- Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315:1243-1249.
- Dahmane N, Sanchez P, Gitton Y, Palma V, Sun T, Beyna M, Weiner H, Ruiz i Altaba A (2001) The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* 128:5201-5212.
- Dawson MR, Polito A, Levine JM, Reynolds R (2003) NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* 24:476-488.
- De Biase LM, Nishiyama A, Bergles DE (2010) Excitability and synaptic communication within the oligodendrocyte lineage. *J Neurosci* 30:3600-3611.
- Dehmelt L, Halpain S (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome biology* 6:204.
- Dimou L, Simon C, Kirchhoff F, Takebayashi H, Gotz M (2008) Progeny of Olig2-expressing progenitors in the gray and white matter of the adult mouse cerebral cortex. *J Neurosci* 28:10434-10442.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397.
- Dobrek L, Thor P (2011) Glutamate NMDA receptors in pathophysiology and pharmacotherapy of selected nervous system diseases. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 65:338-346.
- Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V (2011) Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, Baratta J, Korc M, Endo TL, Duong A, Nguyen G, Karkehabadhi M, Twardzik D, Patel S, Loughlin S (2000) In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14686-14691.
- Fan X, Qiu J, Yu Z, Dai H, Singhal AB, Lo EH, Wang X (2012) A rat model of studying tissue-type plasminogen activator thrombolysis in ischemic stroke with diabetes. *Stroke* 43:567-570.
- Feng L, Hatten ME, Heintz N (1994) Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12:895-908.
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23:373-382.
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:1233-1241.
- Goritz C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O, Frisen J (2011) A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science* 333:238-242.
- Guillemot F (2005) Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon. *Current opinion in cell biology* 17:639-647.
- Guo F, Ma J, McCauley E, Bannerman P, Pleasure D (2009) Early postnatal proteolipid promoter-expressing progenitors produce multilineage cells in vivo. *J Neurosci* 29:7256-7270.
- Guo H, Huang L, Cheng M, Jin X, Zhao Y, Yi M (2006) Serial measurement of serum basic fibroblast growth factor in patients with acute cerebral infarction. *Neurosci Lett* 393:56-59.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 391:85-100.
- Hamilton N, Hubbard PS, Butt AM (2009) Effects of glutamate receptor activation on NG2-glia in the rat optic nerve. *Journal of anatomy* 214:208-218.
- Hampton DW, Rhodes KE, Zhao C, Franklin RJ, Fawcett JW (2004) The responses of oligodendrocyte precursor cells, astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain. *Neuroscience* 127:813-820.

- He M, Xing S, Yang B, Zhao L, Hua H, Liang Z, Zhou W, Zeng J, Pei Z (2007) Ebselen attenuates oxidative DNA damage and enhances its repair activity in the thalamus after focal cortical infarction in hypertensive rats. *Brain Res* 1181:83-92.
- Hou SW, Wang YQ, Xu M, Shen DH, Wang JJ, Huang F, Yu Z, Sun FY (2008) Functional integration of newly generated neurons into striatum after cerebral ischemia in the adult rat brain. *Stroke* 39:2837-2844.
- Hu JG, Lu HZ, Wang YX, Bao MS, Zhao BM, Zhou JS (2010) BMP signaling mediates astrocyte differentiation of oligodendrocyte progenitor cells. *The Tohoku journal of experimental medicine* 222:195-200.
- Hunter AJ, Green AR, Cross AJ (1995) Animal models of acute ischaemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? *Trends Pharmacol Sci* 16:123-128.
- Chen PH, Cai WQ, Wang LY, Deng QY (2008) A morphological and electrophysiological study on the postnatal development of oligodendrocyte precursor cells in the rat brain. *Brain Res* 1243:27-37.
- Cheung WM, Chen SF, Nian GM, Lin TN (2000) Induction of angiogenesis related genes in the contralateral cortex with a rat three-vessel occlusion model. *Chin J Physiol* 43:119-124.
- Chittajallu R, Aguirre A, Gallo V (2004) NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties. *The Journal of physiology* 561:109-122.
- Chvatal A, Anderova M, Ziak D, Sykova E (1999) Glial depolarization evokes a larger potassium accumulation around oligodendrocytes than around astrocytes in gray matter of rat spinal cord slices. *J Neurosci Res* 56:493-505.
- Isokawa M, McKhann GM, 2nd (2005) Electrophysiological and morphological characterization of dentate astrocytes in the hippocampus. *Journal of neurobiology* 65:125-134.
- Jessell TM (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1:20-29.
- Jie L, Yuqin C, Yao D, Shuai H, Yuanyuan W (2011) Occlusion of middle cerebral artery induces apoptosis of cerebellar cortex neural cells via caspase-3 in rats. *Turkish neurosurgery* 21:567-574.
- Jin-qiao S, Bin S, Wen-hao Z, Yi Y (2009) Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural stem cells in neonatal rats after ischemic brain injury. *Brain Dev* 31:331-340.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA (2001) Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4710-4715.
- Kalita Z. a kol. Akutní cévní mozkové příhody. Diagnostika, patofyziologie, management. Maxdorf Praha 2006, s. 623.
- Kam M, Curtis MA, McGlashan SR, Connor B, Nannmark U, Faull RL (2009) The cellular composition and morphological organization of the rostral migratory stream in the adult human brain. *Journal of chemical neuroanatomy* 37:196-205.
- Kaneko N, Sawamoto K (2009) Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions. *Neurosci Res* 63:155-164.
- Kang SH, Fukaya M, Yang JK, Rothstein JD, Bergles DE (2010) NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron* 68:668-681.
- Karadottir R, Hamilton NB, Bakiri Y, Attwell D (2008) Spiking and nonspiking classes of oligodendrocyte precursor glia in CNS white matter. *Nat Neurosci* 11:450-456.
- Kim JS, Kang JK, Chang HC, Lee M, Kim GS, Lee DK, Kim ST, Kim M, Park S (1993) The thrombolytic effect of lumbrokinase is not as potent as urokinase in a rabbit cerebral embolism model. *J Korean Med Sci* 8:117-120.
- Klassen H, Imfeld KL, Ray J, Young MJ, Gage FH, Berman MA (2003) The immunological properties of adult hippocampal progenitor cells. *Vision research* 43:947-956.
- Knutson P, Ghiani CA, Zhou JM, Gallo V, McBain CJ (1997) K⁺ channel expression and cell proliferation are regulated by intracellular sodium and membrane depolarization in oligodendrocyte progenitor cells. *J Neurosci* 17:2669-2682.

- Komitova M, Serwanski DR, Lu QR, Nishiyama A (2011) NG2 cells are not a major source of reactive astrocytes after neocortical stab wound injury. *Glia* 59:800-809.
- Komitova M, Zhu X, Serwanski DR, Nishiyama A (2009) NG2 cells are distinct from neurogenic cells in the postnatal mouse subventricular zone. *J Comp Neurol* 512:702-716.
- Kondo T, Raff M (2000) Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 289:1754-1757.
- Kukley M, Capetillo-Zarate E, Dietrich D (2007) Vesicular glutamate release from axons in white matter. *Nat Neurosci* 10:311-320.
- Larsson E, Mandel RJ, Klein RL, Muzyczka N, Lindvall O, Kokaia Z (2002) Suppression of insult-induced neurogenesis in adult rat brain by brain-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol* 177:1-8.
- Leng J, Jiang L, Chen H, Zhang X (2009) Brain-derived neurotrophic factor and electrophysiological properties of voltage-gated ion channels during neuronal stem cell development. *Brain Res* 1272:14-24.
- Leoni G, Rattray M, Butt AM (2009) NG2 cells differentiate into astrocytes in cerebellar slices. *Mol Cell Neurosci* 42:208-218.
- Li H, Jin G, Qin J, Tian M, Shi J, Yang W, Tan X, Zhang X, Zou L (2011a) Characterization and identification of Sox2⁺ radial glia cells derived from rat embryonic cerebral cortex. *Histochemistry and cell biology* 136:515-526.
- Li WL, Fraser JL, Yu SP, Zhu J, Jiang YJ, Wei L (2011b) The role of VEGF/VEGFR2 signaling in peripheral stimulation-induced cerebral neurovascular regeneration after ischemic stroke in mice. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Experimentation cerebrale* 214:503-513.
- Lin TN, Te J, Lee M, Sun GY, Hsu CY (1997) Induction of basic fibroblast growth factor (bFGF) expression following focal cerebral ischemia. *Brain research Molecular brain research* 49:255-265.
- Liu F, McCullough LD (2011) Middle cerebral artery occlusion model in rodents: methods and potential pitfalls. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011:464701.
- Liu RH, Morassutti DJ, Whittemore SR, Sosnowski JS, Magnuson DS (1999) Electrophysiological properties of mitogen-expanded adult rat spinal cord and subventricular zone neural precursor cells. *Exp Neurol* 158:143-154.
- Liu X, Bolteus AJ, Balkin DM, Henschel O, Bordey A (2006) GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. *Glia* 54:394-410.
- Liu Y, Namba T, Liu J, Suzuki R, Shioda S, Seki T (2010) Glial fibrillary acidic protein-expressing neural progenitors give rise to immature neurons via early intermediate progenitors expressing both glial fibrillary acidic protein and neuronal markers in the adult hippocampus. *Neuroscience* 166:241-251.
- Macdonald RL, Stoodley M (1998) Pathophysiology of cerebral ischemia. *Neurologia medico-chirurgica* 38:1-11.
- Markgraf CG, Kraydieh S, Prado R, Watson BD, Dietrich WD, Ginsberg MD (1993) Comparative histopathologic consequences of photothrombotic occlusion of the distal middle cerebral artery in Sprague-Dawley and Wistar rats. *Stroke* 24:286-292; discussion 292-283.
- McMahon AP (2000) More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* 100:185-188.
- Mecca AP, O'Connor TE, Katovich MJ, Summers C (2009) Candesartan pretreatment is cerebroprotective in a rat model of endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion. *Experimental physiology* 94:937-946.
- Mehta SL, Manhas N, Raghubir R (2007) Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain research reviews* 54:34-66.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008) Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3:265-278.
- Mishima T, Hirase H (2010) In vivo intracellular recording suggests that gray matter astrocytes in mature cerebral cortex and hippocampus are electrophysiologically homogeneous. *J Neurosci* 30:3093-3100.

- Mooney SM, Miller MW (2011) Role of neurotrophins on postnatal neurogenesis in the thalamus: prenatal exposure to ethanol. *Neuroscience* 179:256-266.
- Moore CA, Perderiset M, Kappeler C, Kain S, Drummond D, Perkins SJ, Chelly J, Cross R, Houdusse A, Francis F (2006) Distinct roles of doublecortin modulating the microtubule cytoskeleton. *The EMBO journal* 25:4448-4457.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523-530.
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161:303-310.
- Nowacka MM, Obuchowicz E (2012) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in the central nervous system: a new element in the neurotrophic hypothesis of antidepressant drug action. *Neuropeptides* 46:1-10.
- Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M (2012) Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol* 814:23-45.
- Osterhout DJ, Wolven A, Wolf RM, Resh MD, Chao MV (1999) Morphological differentiation of oligodendrocytes requires activation of Fyn tyrosine kinase. *J Cell Biol* 145:1209-1218.
- Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A (2005) Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132:335-344.
- Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM (2002) Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 52:802-813.
- Pekny M, Nilsson M (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50:427-434.
- Peretto P, Merighi A, Fasolo A, Bonfanti L (1997) Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain research bulletin* 42:9-21.
- Petralia RS, Schwartz CM, Wang YX, Mattson MP, Yao PJ (2011) Subcellular localization of Patched and Smoothened, the receptors for Sonic hedgehog signaling, in the hippocampal neuron. *J Comp Neurol* 519:3684-3699.
- Petridis AK, El Maarouf A (2011) Brain-derived neurotrophic factor levels influence the balance of migration and differentiation of subventricular zone cells, but not guidance to the olfactory bulb. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 18:265-270.
- Pivonkova H, Benesova J, Butenko O, Chvatal A, Anderova M (2010) Impact of global cerebral ischemia on K⁺ channel expression and membrane properties of glial cells in the rat hippocampus. *Neurochem Int* 57:783-794.
- Prajerova I, Honsa P, Chvatal A, Anderova M (2010a) Distinct effects of sonic hedgehog and Wnt-7a on differentiation of neonatal neural stem/progenitor cells in vitro. *Neuroscience* 171:693-711.
- Prajerova I, Honsa P, Chvatal A, Anderova M (2010b) Neural stem/progenitor cells derived from the embryonic dorsal telencephalon of D6/GFP mice differentiate primarily into neurons after transplantation into a cortical lesion. *Cellular and molecular neurobiology* 30:199-218.
- Risner-Janiczek JR, Ungless MA, Li M (2011) Electrophysiological properties of embryonic stem cell-derived neurons. *PLoS One* 6:e24169.
- Rivers LE, Young KM, Rizzi M, Jamen F, Psachoulia K, Wade A, Kessaris N, Richardson WD (2008) PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci* 11:1392-1401.
- Rohl C, Lucius R, Sievers J (2007) The effect of activated microglia on astrogliosis parameters in astrocyte cultures. *Brain Res* 1129:43-52.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 478:359-378.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-7160.
- Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S (2005) Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol* 192:348-356.

- Schools GP, Zhou M, Kimelberg HK (2006) Development of gap junctions in hippocampal astrocytes: evidence that whole cell electrophysiological phenotype is an intrinsic property of the individual cell. *Journal of neurophysiology* 96:1383-1392.
- Simon C, Gotz M, Dimou L (2011) Progenitors in the adult cerebral cortex: Cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *Glia* 59:869-881.
- Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, Siesjo BK (1984) Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand* 69:385-401.
- Sondell M, Sundler F, Kanje M (2000) Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur J Neurosci* 12:4243-4254.
- Stallcup WB, Beasley L (1987) Bipotential glial precursor cells of the optic nerve express the NG2 proteoglycan. *J Neurosci* 7:2737-2744.
- Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH (2007) In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2⁺ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 1:515-528.
- Sulz L, Bacigalupo J (2006) Role of nitric oxide during neurogenesis in the olfactory epithelium. *Biological research* 39:589-599.
- Sun D, Gugliotta M, Rolfe A, Reid W, McQuiston AR, Hu W, Young H (2011) Sustained survival and maturation of adult neural stem/progenitor cells after transplantation into the injured brain. *Journal of neurotrauma* 28:961-972.
- Sypecka J, Sarnowska A, Domanska-Janik K (2009) Crucial role of the local micro-environment in fate decision of neonatal rat NG2 progenitors. *Cell proliferation* 42:661-671.
- Tamura Y, Kataoka Y, Cui Y, Takamori Y, Watanabe Y, Yamada H (2007) Multi-directional differentiation of doublecortin- and NG2-immunopositive progenitor cells in the adult rat neocortex in vivo. *Eur J Neurosci* 25:3489-3498.
- Tan AM, Colletti M, Rorai AT, Skene JH, Levine JM (2006) Antibodies against the NG2 proteoglycan promote the regeneration of sensory axons within the dorsal columns of the spinal cord. *J Neurosci* 26:4729-4739.
- Tanaka Y, Tozuka Y, Takata T, Shimazu N, Matsumura N, Ohta A, Hisatsune T (2009) Excitatory GABAergic activation of cortical dividing glial cells. *Cereb Cortex* 19:2181-2195.
- Thal SC, Thal SE, Plesnila N (2010) Characterization of a 3-vessel occlusion model for the induction of complete global cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Methods* 192:219-227.
- Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR (2012) Combination of Vascular Endothelial and Fibroblast Growth Factor 2 for Induction of Neurogenesis and Angiogenesis after Traumatic Brain Injury. *Journal of molecular neuroscience : MN*.
- Tripathi RB, Clarke LE, Burzomato V, Kessaris N, Anderson PN, Attwell D, Richardson WD (2011) Dorsally and ventrally derived oligodendrocytes have similar electrical properties but myelinate preferred tracts. *J Neurosci* 31:6809-6819.
- Trotter J, Karram K, Nishiyama A (2010) NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain research reviews* 63:72-82.
- Urrea C, Castellanos DA, Sagen J, Tsoulfas P, Bramlett HM, Dietrich WD (2007) Widespread cellular proliferation and focal neurogenesis after traumatic brain injury in the rat. *Restorative neurology and neuroscience* 25:65-76.
- Ventura RE, Goldman JE (2007) Dorsal radial glia generate olfactory bulb interneurons in the postnatal murine brain. *J Neurosci* 27:4297-4302.
- Verkhratsky, Butt. *Glial Neurobiology*. Blackwell Publishers 2007, s. 162.
- Walker TL, Yasuda T, Adams DJ, Bartlett PF (2007) The doublecortin-expressing population in the developing and adult brain contains multipotential precursors in addition to neuronal-lineage cells. *J Neurosci* 27:3734-3742.
- Wang L, Zhang ZG, Gregg SR, Zhang RL, Jiao Z, LeTourneau Y, Liu X, Feng Y, Gerwien J, Torup L, Leist M, Noguchi CT, Chen ZY, Chopp M (2007a) The Sonic hedgehog pathway mediates carbamylated erythropoietin-enhanced proliferation and differentiation of adult neural progenitor cells. *J Biol Chem* 282:32462-32470.

- Wang Y, Jin K, Mao XO, Xie L, Banwait S, Marti HH, Greenberg DA (2007b) VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration. *J Neurosci Res* 85:740-747.
- Wang YQ, Cui HR, Yang SZ, Sun HP, Qiu MH, Feng XY, Sun FY (2009) VEGF enhance cortical newborn neurons and their neurite development in adult rat brain after cerebral ischemia. *Neurochem Int* 55:629-636.
- Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, Ellisman MH, Pekny M (2006) Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17513-17518.
- Wu D, Shibuya S, Miyamoto O, Itano T, Yamamoto T (2005) Increase of NG2-positive cells associated with radial glia following traumatic spinal cord injury in adult rats. *Journal of neurocytology* 34:459-469.
- Yang M, Wang S, Hao F, Li Y, Tang H, Shi X (2012) NMR analysis of the rat neurochemical changes induced by middle cerebral artery occlusion. *Talanta* 88:136-144.
- Yang Z, Suzuki R, Daniels SB, Brunquell CB, Sala CJ, Nishiyama A (2006) NG2 glial cells provide a favorable substrate for growing axons. *J Neurosci* 26:3829-3839.
- Yasuda T, Bartlett PF, Adams DJ (2008) K(ir) and K(v) channels regulate electrical properties and proliferation of adult neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci* 37:284-297.
- Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM (1991) Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64:841-848.
- Ye J, Lin H, Mu J, Cui X, Ying H, Lin M, Wu L, Weng J, Lin X (2010) Effect of basic fibroblast growth factor on hippocampal cholinergic neurons in a rodent model of ischaemic encephalopathy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 107:931-939.
- Zawadzka M, Rivers LE, Fancy SP, Zhao C, Tripathi R, Jamen F, Young K, Goncharevich A, Pohl H, Rizzi M, Rowitch DH, Kessaris N, Suter U, Richardson WD, Franklin RJ (2010) CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell* 6:578-590.
- Zhang Q, Liu G, Wu Y, Sha H, Zhang P, Jia J (2011) BDNF promotes EGF-induced proliferation and migration of human fetal neural stem/progenitor cells via the PI3K/Akt pathway. *Molecules* 16:10146-10156.
- Zhao JW, Raha-Chowdhury R, Fawcett JW, Watts C (2009) Astrocytes and oligodendrocytes can be generated from NG2+ progenitors after acute brain injury: intracellular localization of oligodendrocyte transcription factor 2 is associated with their fate choice. *Eur J Neurosci* 29:1853-1869.
- Zhu JM, Zhao YY, Chen SD, Zhang WH, Lou L, Jin X (2011a) Functional recovery after transplantation of neural stem cells modified by brain-derived neurotrophic factor in rats with cerebral ischaemia. *The Journal of international medical research* 39:488-498.
- Zhu X, Bergles DE, Nishiyama A (2008) NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development* 135:145-157.
- Zhu X, Hill RA, Dietrich D, Komitova M, Suzuki R, Nishiyama A (2011b) Age-dependent fate and lineage restriction of single NG2 cells. *Development* 138:745-753.
- Ziskin JL, Nishiyama A, Rubio M, Fukaya M, Bergles DE (2007) Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. *Nat Neurosci* 10:321-330.

Internetové zdroje:

http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR02_SonicHedgeHog.aspx
(ze dne 22.1.2012).

<http://www.zbynekmlcoch.cz/informace/medicina/neurologie-nemoci-vysetreni/cevni-mozkova-prihoda-mrtvice-komplexni-clanek-trombolyza-fibrinolyza>

(ze dne 22.3.2012).

http://atlases.muni.cz/atlas/stud/atl_cz/main+cnspatol+porkrobens.html#ischem+komplisch

(ze dne 22.3.2012).

<http://www.functionalneurogenesis.com/blog/tag/dentate-gyrus/>

(ze dne 25.3.2012).

http://www.springerimages.com/Images/Biomedicine/1-10.1007_978-3-540-29678-2_2010-0

(ze dne 17.4.2012).

http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Ischemic+Attack%2C+Transient&lang=1

(ze dne 17.4.2012).